

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie  
der Justus Liebig-Universität zu Gießen  
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

---

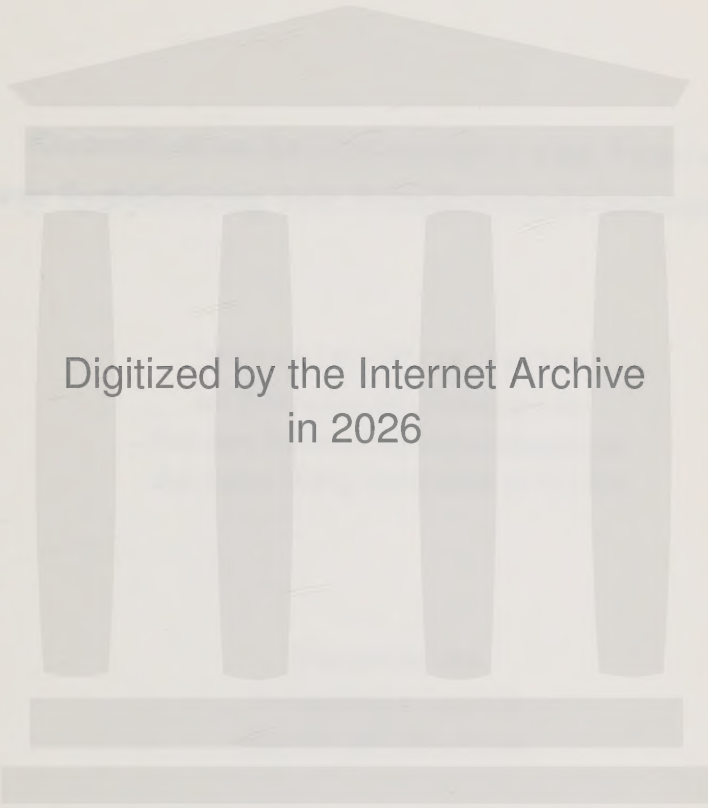
**Quantitative Bestimmungen von Pyocinen  
zur Typisierung von *Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von  
Friedhart Jacob  
Tierarzt aus Unterhaun

Gießen 1972





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie  
der Justus Liebig-Universität zu Gießen  
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

---

**Quantitative Bestimmungen von Pyocinen  
zur Typisierung von *Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von  
Friedhart Jacob  
Tierarzt aus Unterhaun

Gießen 1972

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
in Gießen

---

Dekan: Professor Dr. E. Weiß

Berichterstatter: Professor Dr. H. Blobel

Tag der mündlichen Prüfung: 27. November 1972



# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                    | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1.0 Einleitung                                                                     | 1     |
| 2.0 Literaturübersicht                                                             | 3     |
| 2.1 Eigenschaften der Pyocine                                                      | 3     |
| 2.11 Physikalische und chemische Eigenschaften                                     | 3     |
| 2.12 Biologische Eigenschaften und mögliche<br>Beziehungen zu temperierten Phagen. | 5     |
| 2.2 Typisierung von <u>Pseudomonas aeruginosa</u>                                  | 7     |
| 3.0 Material                                                                       | 11    |
| 3.1 Pseudomonaden                                                                  | 11    |
| 3.11 Pyocinbildner                                                                 | 11    |
| 3.12 Indikatorstämme                                                               | 11    |
| 3.2 Nährmedien                                                                     | 11    |
| 3.21 Feste Nährmedien                                                              | 11    |
| 3.22 Flüssige Nährmedien                                                           | 12    |
| 4.0 Methoden                                                                       | 15    |
| 4.1 Identifizierung der Testkulturen                                               | 15    |
| 4.11 Cytochromoxidase-Reaktion                                                     | 15    |
| 4.12 Oxidative Glucose-Spaltung                                                    | 15    |
| 4.13 Wachstum bei 42°C im Glycerol-Mannitol-<br>Acetamid-Cetrimid-Agar (GMAC)      | 15    |
| 4.2 Herstellung der Mitomycin C-Lösung                                             | 16    |
| 4.3 Pyocingewinnung                                                                | 16    |
| 4.31 Pyocinreinigung                                                               | 17    |
| 4.32 Bestimmung des Proteingehaltes                                                | 18    |
| 4.4 Typisierung                                                                    | 18    |
| 4.41 Titration der Pyocine                                                         | 18    |
| 4.42 Lysespektrum der Pyocine                                                      | 19    |
| 4.43 Pyocin-Empfindlichkeit der Testkulturen                                       | 19    |
| 4.44 Pyocin-Produktion der Testkulturen                                            | 19    |
| 4.5 Pyocin-Stabilität                                                              | 20    |
| 4.6 Charakterisierung einiger Pyocine                                              | 20    |
| 4.61 Serologische Charakterisierung                                                | 20    |
| 4.611 Herstellung der Antiseren                                                    | 20    |

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 4.612 Bestimmung der <b>Anti-Pyocin-Titer</b>                     | 20 |
| 4.613 Bestimmung der Neutralisationskonstanten<br>einiger Pyocine | 21 |
| 4.62 Diskelektrophoretische Charakterisierung                     | 22 |
| 4.621 Vertikale Polyacrylamidgel-Disk-<br>Elektrophorese          | 22 |
| 4.622 Auswertung der Banden                                       | 23 |
| 5.0 Ergebnisse                                                    | 24 |
| 5.1 Identifizierung der Testkulturen                              | 24 |
| 5.2 Typisierungsergebnisse                                        | 24 |
| 5.21 Ermittlung der RTD                                           | 24 |
| 5.22 Lysespektrum                                                 | 25 |
| 5.23 Pyocin-Empfindlichkeit                                       | 28 |
| 5.24 Reaktionshäufigkeit der einzelnen Pyocine                    | 39 |
| 5.25 Typisierbarkeit                                              | 42 |
| 5.26 Pyocin-Produktion der Testkulturen                           | 43 |
| 5.27 Bestimmung identischer <b>Stämme</b>                         | 49 |
| 5.3 Pyocin-Stabilität in der RTD                                  | 49 |
| 5.4 Pyocinreinigung                                               | 50 |
| 5.5 Charakterisierung einiger Pyocine                             | 51 |
| 5.51 Serologische Charakterisierung                               | 51 |
| 5.511 <b>Anti-Pyocin-Titer</b>                                    | 51 |
| 5.512 Neutralisationskonstanten einiger<br>Pyocine                | 52 |
| 5.52 Diskelektrophoretische Charakterisierung                     | 54 |
| 6.0 Diskussion                                                    | 55 |
| 7.0 Zusammenfassung                                               | 59 |
| 8.0 Literaturverzeichnis                                          | 60 |
| Lebenslauf                                                        |    |

## 1.0 Einleitung

Für die epidemiologische Aufklärung von Infektionszusammenhängen ist es wichtig, einzelne Stämme einer Bakterienart hinsichtlich bestimmter Merkmale genau zu charakterisieren. Nachdem in der Vergangenheit zur Typisierung von Pseudomonas aeruginosa fast ausschließlich die Methode der serologischen Differenzierung zur Anwendung kam, wurden mit der Entdeckung der Bakteriocine neue Möglichkeiten geschaffen. Bakteriocine sind Substanzen mit Proteincharakter, die von bestimmten Stämmen einer Bakterienart gebildet werden, und die auf andere Stämme der gleichen Art wirken (JACOB et al.<sup>40</sup>). Von den Antibiotika unterscheiden sie sich durch ihr engeres Wirtsspektrum (HOLLAND<sup>28</sup>). Eine Übersicht über den neuesten Stand der Bakteriocinforschung ist von BRANDIS<sup>7</sup> veröffentlicht worden. Die Bakteriocinotypie bzw. die Bakteriocinogenotypie haben bisher eine praktische Bedeutung erlangt bei der Typisierung von Escherichia coli durch Colicine<sup>68</sup> und von P. aeruginosa durch Pyocine<sup>16,19,63,73</sup>.

P. aeruginosa, bereits von LÜCKE<sup>57</sup> 1862 als übertragbarer Keim beschrieben, hat für Human- und Veterinärmedizin gleichermaßen an Bedeutung gewonnen. Die Pseudomonaden besitzen eine hohe natürliche Resistenz gegen viele gebräuchliche Antibiotika<sup>3</sup>. Außerdem hat der starke Einsatz von Antibiotika und antibakteriellen Chemotherapeutika<sup>17</sup> durch Selektion zu einer weiteren Resistenz und weitgehend zum "Hospitalismus"<sup>66</sup> von Pseudomonaden geführt. Beim Menschen, besonders bei Patienten mit geschwächter Immunabwehr<sup>67</sup>, wird P. aeruginosa als Erreger von Infektionen des Magen-Darmtrakts (vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern), der Harnwege, des Respirationsapparates und der Haut angesehen<sup>9</sup>. Auch ist der Keim häufig bei Allgemeininfektionen und infizierten Brandwunden anzutreffen.<sup>67</sup>

Bei Neugeborenen verlaufen solche Infektionen nicht selten tödlich<sup>75</sup>.

Bei den Haustieren trat P. aeruginosa meist als Erreger von Mastitiden<sup>62</sup> und Genitalinfektionen<sup>20</sup> in Erscheinung. Neben diesem schon seit langem bekannten Erscheinungsbild ist in den letzten Jahren die zunehmende Bedeutung der Pseudomonaden für die Milchhygiene erkannt worden<sup>45</sup>. Gerade in diesem Zusammenhang ist die genaue Charakterisierung eines Stammes von großer Wichtigkeit, um den Ausgangspunkt einer Kontamination von Milch oder Milchprodukten ermitteln zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine quantitative Bestimmung der Pyocine auf der Basis einer ROUTINE-TEST-DILUTION (RTD) möglich ist. Damit könnte eine wesentliche Verbesserung der Pyocintypisierung erzielt werden.

## 2.0 Literaturübersicht

### 2.1 Eigenschaften der Pyocine

#### 2.11 Physikalische und chemische Eigenschaften

Im Jahre 1953 berichteten JACOB et al.<sup>40</sup> über eine anti-biotische Substanz bei P. aeruginosa, die in ihrer Wirkungsweise den von GRATIA und FREDERICQ<sup>23</sup> beschriebenen Colicinen ähnlich war und ein auf P. aeruginosa-Stämme begrenztes Wirtsspektrum besaß. In Analogie zu den Colicinen wurde diese Substanz Pyocin genannt. Eingehendere Untersuchungen von JACOB<sup>39</sup> ergaben, daß das Pyocin nicht dialysierbar war, aber relativ schnell im Agar diffundierte. Es sedimentierte nicht bei 20 000 x g während 2 Std. Seine Aktivität wurde nach 30 Min. bei 60°C und pH 7 nicht beeinflusst, aber nach 10 Min. bei 80°C um 90 % herabgesetzt. Das Pyocin erwies sich als resistent gegenüber Proteasen (Trypsin, Papain) und Ribo- und Desoxyribonuklease. Seine Synthese konnte durch UV-Bestrahlung und durch Mitomycin C induziert werden. Die Häufigkeit des Vorkommens pyocinogener Stämme wurde in der Literatur von mehreren Autoren (ZABRANSKY und DAY<sup>76</sup>, DARRELL und WAHBA<sup>12</sup>, GILLIES und GOVON<sup>19</sup>, SJÖBERG und LINDBERG<sup>69</sup>) mit 88 - 95 % angegeben.

Nach Fällung mit Ammoniumsulfat und mit Hilfe der Säulenchromatographie (DEAE-CELLULOSE) gelang es KAGEYAMA<sup>41</sup> und HIGERD et al.<sup>26</sup>, ein 1000-fach gereinigtes Pyocin zu erhalten mit einer Sedimentationskonstanten von 90,5 S und einem geschätzten Molekulargewicht von 10<sup>7</sup>. Die Wirksamkeit des gereinigten Produktes wurde durch Einfrieren und Auftauen, im Gegensatz zum ungereinigten Pyocin, zerstört (HIGERD et al.<sup>26</sup>). Das Vorhandensein einer gereinigten Pyocinpräparation ermöglichte es, umfangreiche morphologische Untersuchungen durchzuführen. So konnte KAGEYAMA<sup>41</sup> zeigen, daß das von ihm gereinigte Pyocin aus stäbchenartigen Partikeln bestand und den Schwänzen von Phagen ähnlich war.

ISHII et al.<sup>38</sup> untersuchten die Feinstruktur dieses Pyocins und wiesen nach, daß es sich um stäbchenartige, innen hohle Partikel handelte, die aus einer kontraktilen Scheide und einem inneren Zylinder bestanden. Die Scheide setzte sich aus zahlreichen Untereinheiten zusammen. In ihrem Aussehen entsprachen die Pyocinpartikel den Schwänzen der geradzah-  
ligen T-Phagen. BRADLEY<sup>6</sup> und HIGERD et al.<sup>27</sup> vervollstän-  
digten diese Ergebnisse und konnten zeigen, daß nur die nicht  
kontrahierten Pyocinpartikel in der Lage waren, sich an die  
Zellwand eines sensiblen Indikatorstammes zu adsorbieren.  
Nach Adsorption dieser Partikel erfolgte die Kontraktion der  
Scheide.

Während KAGEYAMA<sup>41</sup> und HIGERD et al.<sup>26</sup> ihre Pyocinpräparation  
aus einem flüssigen Kulturmedium Mitomycin C bzw. UV-indu-  
zierter Zellen gewannen, isolierten HOMMA et al.<sup>30</sup> aus dem  
Autolysat von P. aeruginosa-Stämmen ein Protein mit Pyocin-  
aktivität. Dieses Pyocin wurde von HOMMA et al.<sup>30</sup> als der  
Eiweißbestandteil des Endotoxins von P. aeruginosa angesehen.  
Weitere Untersuchungen ergaben, daß der Endotoxin-Komplex des  
Autolysates (ein Lipopolysaccharid-Protein-Komplex) keine  
Pyocinaktivität aufwies, während das von diesem Komplex abge-  
trennte Protein eine solche besaß (HOMMA, SUZUKI, FUKUYAMA<sup>32</sup>).  
HOMMA und SUZUKI<sup>31</sup> gelang es außerdem, aus der Zellwand  
ultraschallbehandelter Zellen ein Protein mit Pyocinaktivität  
zu gewinnen, das sog. Zellwandprotein A. Die Wirksamkeit dieser  
beiden Pyocine war praktisch identisch. Das Zellwandprotein A  
hatte im Gegensatz zu dem von KAGEYAMA<sup>41</sup> isolierten Pyocin eine  
Sedimentationskonstante von 20 S.

## 2.12 Biologische Eigenschaften der Pyocine und mögliche Beziehungen zu temperierten Phagen

Die Wirkungsweise der Pyocine ist im einzelnen bis heute noch nicht völlig geklärt. Nach den Untersuchungen von JACOB<sup>39</sup> genügte die Adsorption eines Pyocin-Partikels, um eine sensible Bakterienzelle abzutöten. KAGEYAMA et al.<sup>42</sup> konnten in ihren Versuchen zeigen, daß die Adsorption eines Partikels an eine empfindliche Zelle noch bei 0°C erfolgte, daß aber unter diesen Bedingungen keine bakteriolytische Wirkung zu beobachten war. KAZIRO und TANAKA<sup>43</sup> untersuchten den Einfluß des von KAGEYAMA<sup>41</sup> gereinigten Pyocins auf den Stoffwechsel der Wirtszelle und stellten fest, daß unmittelbar nach Zusatz und Adsorption des Pyocins die Synthese makromolekularer Substanzen (Protein, DNS und RNS) unterbrochen wurde. Aufgrund weiterer Untersuchungen<sup>44</sup> waren die gleichen Autoren der Ansicht, daß in der sensiblen Zelle die Ribosomen ein Angriffspunkt für das Pyocin darstellten. Dabei war anzunehmen, daß es sich wahrscheinlich nicht um eine direkte Beeinflussung der Ribosomen durch das Pyocin handelte, da ein Zusatz von Pyocin zu einer Ribosomenfraktion in vitro sich nicht auf ihre Aktivität auswirkte. Vielmehr war zu vermuten, daß die Pyocin-Partikel an der Zelloberfläche adsorbiert blieben, und von dort aus in den intrazellulären Stoffwechsel eingriffen.

Aus den Untersuchungen von HIGERD et al.<sup>26</sup> ging hervor, daß das Pyocin keine Mäusetoxizität besaß (bis zu 1.400.000 Einheiten = 276 mg Protein). Auch konnten keine Dermatonekrosen bei Kaninchen hervorgerufen werden (bis zu 36.000 Einheiten).

Die antigenen Eigenschaften der Pyocine wurden von IKEDA et al.<sup>37</sup>, HOMMA et al.<sup>34,35</sup> und SHIONOYA et al.<sup>69</sup> untersucht. SHIONOYA et al.<sup>69</sup> konnten zeigen, daß die Pyocine mit phagenschwanzähnlicher Struktur serologisch untereinander identisch waren, obwohl ihre Donorstämme serologisch nicht übereinstimmten und auch ihr Wirtsspektrum nicht gleich war. Keine serologische Übereinstimmung bestand hingegen zwischen den phagenähnlichen Pyocinen und denen, die aus der Zellwand bzw. aus dem Autolysat von P. aeruginosa isoliert worden waren. Untersuchungen über die Beziehungen zwischen den phagenschwanzähnlichen Pyocinen und temperierten Phagen ergaben, daß die Pyocin-Antiseren die Phagen in ihrer Wirkung neutralisierten und umgekehrt<sup>33,69</sup>. Demgegenüber wurden die Phagen in ihrer Aktivität durch die Zellwand-Pyocin-Antiseren nicht beeinflusst. Diese Untersuchungsergebnisse veranlaßten HOMMA et al.<sup>35</sup> die Pyocine in 2 Gruppen einzuteilen. Die 1. Gruppe bestand aus Pyocinen mit Eiweißcharakter ohne morphologische Struktur. Diese Pyocine sollten keine serologischen Beziehungen zu temperierten Phagen besitzen. Die 2. Gruppe sollte von Pyocinen mit phagenschwanzähnlicher Struktur gebildet werden. Hier war eine serologische Beziehung zu temperierten Phagen festzustellen.

Die Tatsache, daß die letztgenannten Pyocine morphologisch mit den Schwänzen der Phagen, zu denen sie eine enge serologische Beziehung besaßen, nahezu identisch waren, ließ HOMMA et al.<sup>33</sup> vermuten, daß es sich bei den phagenähnlichen Pyocinen um eine defekte Form von temperierten Phagen handelte.

## 2.2 Typisierung von P. aeruginosa

Für die Typisierung von P. aeruginosa kam zunächst die serologische Differenzierung in Frage. Umfangreiche serologische Studien wurden schon 1916 von TROMMSDORF<sup>72</sup> angestellt, der mit Hilfe des Agglutinationstestes 27 P. aeruginosa-Kulturen in 5 Gruppen einteilte. CHRISTIE<sup>10</sup> wählte für die serologische Charakterisierung von 138 Stämmen die Präzipitationsmethode und teilte die untersuchten Stämme aufgrund ihrer Trichloroessigsäureextrakte in 13 Gruppen ein. VAN DEN ENDE<sup>14</sup> bediente sich der gleichen Methode und vermochte aus 24 Stämmen 6 serologische Gruppen aufzustellen. Weitere Beiträge zur serologischen Differenzierung wurden in den letzten Jahren von KÖHLER<sup>52</sup>, HABS<sup>25</sup> und KLEINMEIER<sup>48,49,50</sup> geleistet. Unter Zuhilfenahme der Agglutinationsreaktion und unter besonderer Berücksichtigung der O-Antigene ordnete HABS<sup>25</sup> von 78 Stämmen 70 in 12 O-Gruppen ein. MIEKELSEN<sup>58,59</sup> konnte unter Anwendung des Röhrchenagglutinationstestes die von HABS<sup>25</sup> angegebenen Ergebnisse bestätigen. Zur O-Gruppenbestimmung wurde von KLEINMEIER<sup>50</sup> ein einfaches Verfahren in Form der Objektträgermethode entwickelt. Diese Technik ist besonders für erste Orientierungsuntersuchungen geeignet. In einer weiteren Arbeit stellte KLEINMEIER<sup>48</sup> fest, daß zwischen den Ergebnissen des Agglutinationstestes und denen des Präzipitationstestes keine Unterschiede bestanden. Auf der Basis der O-Einteilung nach HABS<sup>25</sup> führten KLEINMEIER et al.<sup>49</sup> umfangreiche Studien über die Geißelantigene von P. aeruginosa durch. Unter Verwendung sog. Vollseren mit Antikörpern gegen O- und H-Antigene, O-Seren und Antiseren gegen die thermolabilen Antigene gelang es KLEINMEIER et al.<sup>49</sup> unterschiedliche Agglutinationsformen sichtbar zu machen, die zu der Vermutung Anlaß gaben, daß es sich um verschiedenartige Antigene handelte. Die thermolabilen Antigene zeigten keine serologisch einheitlichen Merkmale, und traten unabhängig von der O-Antigenstruktur eines Stammes auf.

Eine weitere Möglichkeit der Differenzierung von P. aeruginosa bestand in der Phagentypisierung. Verschiedene Autoren<sup>15,21,24</sup> erzielten mit dieser Methode brauchbare Ergebnisse, wobei dieser Technik, wie auch den serologischen Typisierungsverfahren, der Nachteil anhaftete, daß sie in ihrer Durchführbarkeit für epidemiologische Untersuchungen zu aufwendig war.

Aufgrund des engen Wirtsspektrums der Pyocine wurde schon bald nach ihrer Entdeckung versucht, diese zur Typisierung zu benutzen. HOLLOWAY<sup>29</sup> gelang es, unter Berücksichtigung der Lysogenität und der Pyocinogenität 214 Stämme in 18 verschiedene Gruppen zu unterteilen. Bei Berücksichtigung nur der Pyocinogenität ergaben sich 6 unterschiedliche Gruppen. HOLLOWAY<sup>29</sup> benutzte für seine Untersuchungen die Methode nach FISK<sup>18</sup>. Nach weiteren orientierenden Versuchen von PAPA VASSILIOU<sup>64</sup> führten DARRELL und WAHBA<sup>12</sup> mit der von ABBOTT und SHANNON<sup>1</sup> für die Colicintypisierung angegebenen Methode Untersuchungen an 1090 Stämmen durch. DARRELL und WAHBA<sup>12</sup> gelang es, 92,4 % der untersuchten Kulturen zu typisieren, wobei 11 Pyocin-Typen festgestellt wurden. GILLIES und GOVAN<sup>19</sup> konnten mit einer modifizierten Methode von 3227 Kulturen 84,4 % typisieren. Mit Hilfe von 8 Indikatorstämmen, die aus mehr als 300 Stämmen ausgewählt worden waren, war es möglich, 36 Reaktionsbilder zu unterscheiden. In einer späteren Untersuchung<sup>22</sup> konnte noch ein 37. Typ ermittelt werden. GILLIES und GOVAN<sup>19</sup> betrachteten die einfache Durchführbarkeit der Pyocintypisierung im Gegensatz zur Serologischen- oder Bakteriophagentypisierung als einen besonderen Vorteil. Durch die Inkubation der Donorstämme bei 32°C für 14 Std. konnten sie eindeutiger Ergebnisse erzielen als DARRELL und WAHBA<sup>12</sup>. Die Typisierungsergebnisse unterschieden sich nach Aufbewahrung der Donorstämme zwischen 3 Mon. und 2 Jahren nur unwesentlich. Die gute Anwendbarkeit dieser Methode für epidemiologische Zwecke wurde bereits von mehreren Autoren bestätigt. (PHILLIPS et al.<sup>65</sup>, ZABRANSKY und DAY<sup>76,77</sup>).

ZIV et al.<sup>77</sup> untersuchten mit der Methode nach GILLIES und GOVAN<sup>19</sup> 134 aus Mastitisbeständen isolierte Pseudomonadenkulturen, von denen sich 89,6 % als typisierbar erwiesen. Dabei wurde ein gehäuftes Vorkommen des Pyocin-Typs 1 beobachtet (65,7 %). Durch Erweiterung der 8 ursprünglichen Indikatorstämme auf insgesamt 10 gelang es, die ermittelten Pyocin-Typen noch weiter in Subtypen zu unterteilen. In weiteren Arbeiten stellten MUSHIN und ZIV<sup>60,61</sup> Untersuchungen darüber an, ob ein Zusammenhang bestand zwischen dem Vorkommen bestimmter Biotypen von P. aeruginosa bei Mensch, Haustieren und deren Umgebung und dem Auftreten von klinischen und subklinischen Mastitiden. Dabei konnten MUSHIN und ZIV<sup>60,61</sup> feststellen, daß in allen 3 Untersuchungsgebieten in der überwiegenden Zahl der Fälle das Vorkommen des Pyocin-Typs 1 zu finden war. Dies ließ darauf schließen, daß ein direkter Zusammenhang bestand zwischen der Umwelt und der Häufigkeit der auftretenden Mastitiden.

Während einige Autoren die Pyocin-Produktion der untersuchten Stämme als Kriterium zur Typisierung benutzten, ging OSMAN<sup>63</sup> von der Pyocin-Empfindlichkeit aus und konnte mit Hilfe von 4 Kulturfiltraten, die von serologisch unterschiedlichen Stämmen gewonnen wurden, 10 Reaktionsbilder unterscheiden. Diese 10 Typen erwiesen sich als konstant und für epidemiologische Zwecke brauchbar. LEWIS<sup>54</sup> benutzte ebenfalls die Pyocin-Empfindlichkeit zur Typisierung. Durch die Verwendung von 7 Stämmen, die Pyocine mit unterschiedlichem Lysepektrum bildeten, unterteilte er 169 Stämme in 17 Typen.

Durch die Kombination der Pyocin-Wirksamkeit mit der Pyocin-Empfindlichkeit ("fingerprint" - Methode) der zu testenden Kulturen und durch die Verwendung von Mitomycin C zur Induktion von Pyocin gelang es FARMER und HERMAN<sup>16</sup>, die Wirksamkeit der Pyocintypisierung noch weiter zu erhöhen (100 %ige Typisierung).

Für die epidemiologische Aufklärung von Pseudomonaden-Infektionen war die Pyocintypisierung häufig mit der serologischen Differenzierung oder der Phagentypisierung kombiniert worden. WAHBA<sup>73</sup> bediente sich neben der Pyocintypisierungsmethode der Objektträgeragglutination. Er konnte mit den Seren gegen 18 Stämme 22 Pyocinserotypen ermitteln. Aufgrund weiterer Untersuchungen<sup>74</sup> schien ein Zusammenhang zwischen Pyocin-Typ und Serotyp zu bestehen. Dies traf für die Pyocin-Typen G, K, L und P und die Serotypen 14, 1, 3, 9 und 6 zu. Auch war es möglich, einzelne Serotypen in mehrere Pyocin-Typen aufzugliedern. Die Zahl der untersuchten Stämme war aber noch zu gering, um eine endgültige Aussage über die Beziehung zwischen Pyocin-Typen und Serotypen machen zu können. CSISZAR et al.<sup>11</sup> konnten die von WAHBA<sup>73</sup> erzielten Ergebnisse in jüngster Zeit bestätigen. Die Autoren kamen aufgrund ihrer Typisierungsversuche an 1043 Pseudomonaden-Stämmen mit der Methode nach GILLIES und GOVAN<sup>19</sup> und mit Hilfe der serologischen Differenzierung von 543 P. aeruginosa-Kulturen zu dem Ergebnis, daß eine deutlich erkennbare Korrelation zwischen den O-Gruppen und einzelnen Pyocin-Typen bestand. Auch konnte gezeigt werden, daß zahlreiche Serotypen sich in mehrere Pyocin-Typen unterteilen ließen. AYLIFFE et al.<sup>4</sup> hielten die Kombination der Pyocintypisierung mit der serologischen Differenzierung und der Lysotomie für besonders geeignet, um bei epidemiologischen Untersuchungen zu brauchbaren Ergebnissen zu gelangen. Sie berichteten von einer Pseudomonaden-Infektion auf einer neurochirurgischen Abteilung, deren Ausgangspunkt durch die Kombination dieser 3 Methoden eindeutig ermittelt werden konnte. Ähnliche Resultate wurden von KNIGHTS et al.<sup>51</sup> mit den gleichen Methoden anläßlich einer schweren Infektion auf einer Neugeborenenstation erzielt.

SJÖBERG und LINDBERG<sup>70</sup> benutzten für ihre Differenzierungsversuche die Lysotomie mit 18 Testphagen und die Pyocinmethode nach WAHBA<sup>12</sup>. Von 374 Stämmen wurden mit der RTD bei der Lysotomie 96,5 % erfaßt, während von 356 Stämmen mit der Pyocinmethode 87,7 % typisiert werden konnten.

### 3.0 Material

#### 3.1 Pseudomonaden

Im Rahmen der Typisierung wurden 91 Kulturen von P. aeruginosa untersucht. Ihre Herkunft ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

#### 3.11 Pyocinbildner

Zur Prüfung der Pyocin-Empfindlichkeit der 91 Testkulturen wurden die 21 Standard-Pyocine A-U von FARMER und HERMAN<sup>16</sup> benutzt<sup>+</sup>.

#### 3.12 Indikatorstämme

Zur Ermittlung der RTD, des Lysespektrums der verwendeten Pyocine und zur Prüfung der Pyocin-Produktion der 91 untersuchten Kulturen wurden die 27 Indikatorstämme von FARMER und HERMAN<sup>16</sup> verwendet<sup>++</sup>.

### 3.2 Nährmedien

#### 3.21 Feste Nährmedien

Zur Herstellung eines Verdünnungsausstriches wurde Trypticase Soy Agar (TSA)<sup>+++</sup> verwendet. Zur Sterilitätskontrolle und zur Trocknung wurden die Platten 48 Std. bei 37°C bebrütet.

---

+ American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA (25313 - 25339)

++ American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA (25340 - 2560)  
Die Standard-Pyocin-Stämme und die Indikatorstämme wurden uns freundlicherweise von Dr. Lloyd G. Herman, National Institutes of Health, Bethesda, Md., übersandt.

+++ Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, USA

### 3.22 Flüssige Nährmedien

Als flüssiges Nährmedium zur Kultivierung der Pseudomonaden diente Trypticase Soy Broth (TSB)<sup>+</sup>. Die Bouillon wurde zu je 10 ml in 50-ml-Erlenmeyerkolben und zu je 20 ml in 100-ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt und 15 Min. bei 121°C und 1,1 atü Druck autoklaviert.

3.23 Die längere Aufbewahrung der Pseudomonaden erfolgte in Lackmusemilch. In diesem Medium konnten die Pseudomonaden mindestens 1 Jahr bei 4°C aufbewahrt werden.

Tabelle 1

#### Herkunft der Pseudomonaden-Kulturen

| Kultur Nr. | Herkunft |                              |
|------------|----------|------------------------------|
| 52-53 +    | Rind,    | Mastitis (290,293)           |
| 57-59 +    | Rind,    | Mastitis (310,316,312)       |
| 62 +       | Rind,    | Mastitis (323)               |
| 64 +       | Rind,    | Mastitis (327)               |
| 67 +       | Rind,    | Mastitis (335)               |
| 69 +       | Rind,    | Mastitis (337)               |
| 72 +       | Rind,    | Mastitis (XI)                |
| 74-75 ++   | Mensch., | (B10, B39)                   |
| 76-81 ++   | Mensch., | (M8,M283,M584,M593,S17)      |
| 83-84 ++   | Mensch., | (8/39,511)                   |
| 87-89 +++  | Mensch., | Trachealsekret (28,101,115)  |
| 92-94 +++  | Mensch., | Trachealsekret (197,216,226) |
| 95 ++++    | Mensch., | Abstrich                     |

Fortsetzung der Tabelle 1 auf Seite 13

+ Difco Laboratories, Detroit, USA

Fortsetzung der Tabelle 1

| Kultur Nr. |       | Herkunft |              |
|------------|-------|----------|--------------|
| 97         | ++++  | Mensch,  | Urin         |
| 103        | ++++  | Mensch,  | Urin         |
| 111        | ++++  | Mensch,  | Sputum       |
| 116        | ++++  | Mensch,  | Abstrich     |
| 117        | +++++ |          | Rohmilch     |
| 122        | +++++ |          | Rohmilch     |
| 129-131    | +++++ |          | Rohmilch     |
| 134        | +++++ |          | Schlagsahne  |
| 137        | +++++ |          | Rohmilch     |
| 138        | +++++ |          | Rahm erhitzt |
| 139        | +++++ |          | Rohmilch     |
| 151-164    | +++++ |          | Rohmilch     |
| 165        | +++++ |          | Magermilch   |
| 166        | +++++ |          | Rohmilch     |
| 167        | ++++  | Mensch,  | Urin         |
| 168        | ++++  | Mensch,  | Gewebe       |
| 169        | ++++  | Mensch,  | Abstrich     |
| 170-176    | ++++  | Mensch,  | Urin         |
| 179        | ++++  | Mensch,  | Urin         |
| 180-181    | ++++  | Mensch,  | Abstrich     |
| 182-185    | ++++  | Mensch,  | Urin         |
| 186-187    | ++++  | Mensch,  | Abstrich     |
| 188        | +     | Rind,    | (343/318d)   |
| 189        | +     | Rind,    | (346/324b)   |
| 190        | +     | Rind,    | (347/326c)   |
| 194        | +     | Rind,    | (355/124a)   |
| 196        | +     | Rind,    | (358/434a)   |
| 197        | +     | Rind,    | (359/434c)   |
| 200        | +     | Rind,    | (362/485d)   |

Fortsetzung der Tabelle 1 auf Seite 14

Fortsetzung der Tabelle 1

| Kultur Nr.    | Herkunft         |
|---------------|------------------|
| 207 +++++     | Mensch, Urin     |
| 213-216 +++++ | Mensch, Urin     |
| 255 +++++     | Mensch, Urin     |
| 262 +++++     | Mensch, Urin     |
| 272 +++++     | Mensch, Urin     |
| 281 +++++     | Mensch, Urin     |
| 290 +++++     | Mensch, Abstrich |
| 293 +++++     | Mensch, Urin     |
| 296 +++++     | Mensch, Urin     |

- + Dr.G. Ziv, Kimron Veterinary Institute  
Bet-Dagan, Israel
- ++ Dr.Zabransky, Section of Microbiology,  
Mayo Clinic, Rochester, Minnesota
- +++ Prof. F.H. Caselitz, Allgemeines Krankenhaus,  
Hamburg-Altona
- ++++ Hygiene-Institut der Universität Gießen
- +++++ Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
Abtlg. Hygiene der Milch, Fische und Eier

#### 4.0 Methoden

##### 4.1 Identifizierung der Pseudomonaden

###### 4.11 Cytochromoxidase-Reaktion (KOVACS<sup>53</sup>)

Lösung A: 1 %ige wässrige Lösung von N,N-Dimethyl-phenylen-diammoniumdichlorid<sup>+</sup>.

Lösung B: 1 %ige alkoholische Naphtollösung.

Die zu untersuchende Kultur wurde auf Filterpapier in einer Petrischale ausgestrichen und mit 2 Tropfen des aus 3 Teilen der Lösung A und 2 Teilen der Lösung B bestehenden Cytochromoxidase-Reagenz zusammengegeben. Eine positive Reaktion war an einer blauviolettten Verfärbung nach durchschnittlich 20 - 30 Sek. zu erkennen.

###### 4.12 Oxidative Glucose-Spaltung

Der Nachweis der oxidativen Glucose-Spaltung erfolgte mit dem Medium nach HUGH und LEIFSON<sup>36</sup>. Das in Reagenzgläser zu je 2 ml abgefüllte Medium, dem nach dem Autoklavieren 1 % Glucose (Endkonzentration) zugesetzt worden war, wurde mit einer Stichöse beimpft und 16 Std. bei 37°C bebrütet. Bei einer positiven Reaktion trat eine Gelbfärbung des blaugrünlischen Agars ein.

###### 4.13 Wachstum bei 42°C im Glycerol-Mannitol-Acetamid-Cetrimid-Agar (GMAC<sup>46</sup>)

Die Lösung A des GMAC-Mediums enthielt: 20,0 g Pepton, 1,4 g MgCl<sub>2</sub>, 10,0 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 13,6 g Agar, 0,3 g Cetrimid (Cethyl-Trimethylammoniumbromid)<sup>+</sup>, 5 g Glycerin und 5,0 g Mannit in 900 g aqua dest (pH 6,8). Die Lösung B setzte sich aus 10,0 g Acetamid und 0,012 g Phenolrot in 100 g aqua dest (pH 6,8) zusammen.

---

+ Firma E. Merck, Darmstadt

Das als Schrägagar in Reagenzgläser abgefüllte Medium wurde mit einer Kultur beimpft. Nach 48stündiger Bebrütung bei 42°C war eine positive Reaktion an dem Farbumschlag von gelb nach rotviolett zu erkennen.

#### 4.2 Herstellung der Mitomycin C-Lösung

Von dem in kristalliner Trockensubstanz vorliegenden Mitomycin C<sup>+</sup> wurden 2 mg in 66 ml sterilem aqua bidest. gelöst. Das entsprach einer Konzentration von 30 µg Mitomycin C / ml.

#### 4.3 Gewinnung von Pyocin

Die Pyocin-Produktion zum Zwecke der Typisierung erfolgte nach FARMER und HERMAN<sup>16</sup>. Zehn ml TSB in 50-ml-Erlenmeyerkolben wurden mit einer Einzelkolonie einer bei 32°C 24 Std. bebrüteten Kultur beimpft und 2 Std. bei 32°C in einem Wasserbad unter ständigem Schütteln bebrütet. Dabei erreichte die Kultur eine optische Dichte (OD) von 0,4 bei 550 nm. Anschließend wurde die Bouillon zu 20 ml TSB in 100-ml-Erlenmeyerkolben hinzugegeben und bei 32°C weitere 2 Std. bebrütet. Nach Zugabe von 1 ml Mitomycin C (1 µg / ml Bouillon) wurde nochmals 6 Std. bei 32°C bebrütet. Je Erlenmeyerkolben wurden 5 ml Chloroform zugesetzt und der Gesamteinhalt nach kräftigem Schütteln in einen mit einem Schraubverschluß versehenen 50-ml-Zentrifugenbecher abgefüllt. Nach Zentrifugieren für 10 Min. bei 5000 x g wurden 15 ml abpipettiert und in einem sterilen Behälter bei 4°C aufbewahrt.

Zur Gewinnung einer größeren Menge Pyocins und anschließender Reinigung mit Ammoniumsulfat kam die Methode nach HIGERD et al.<sup>26</sup> zur Anwendung. Eine Öse einer bei 37°C bebrüteten 24 Std.-Kultur wurde in physiologischer NaCl suspendiert und auf eine OD<sup>++</sup> von 0,5 bei 660 nm. eingestellt.

---

+ Firma Sigma, Chemical Company, St. Louis, Miss., USA

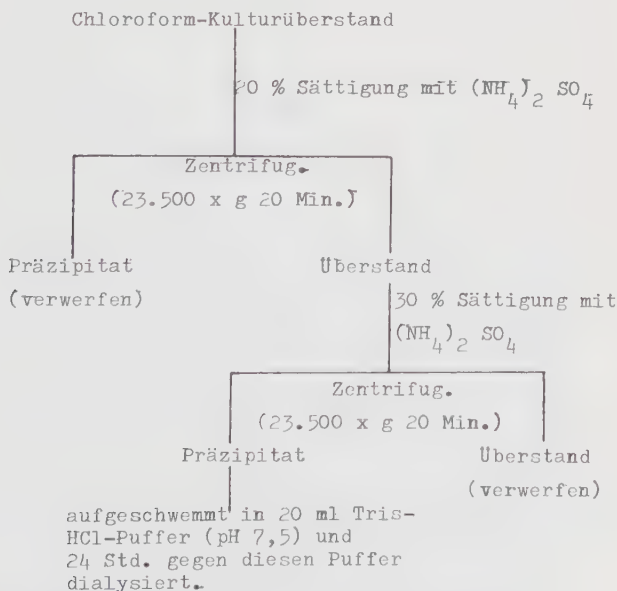
++ Photometer Spectronic 20, Bausch und Lomb GmbH., Frankfurt/M.

Einhundert ml TSB in einem 1000-ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 1 ml dieser Suspension inokuliert und 3 Std. bei 37°C auf einer Schüttelmaschine (60 U/Min.)<sup>+</sup> bebrütet. Nach Zugabe der Mitomycin C-Lösung (100 µg/100 ml Bouillon) wurde weitere 4 Std. bebrütet. Die Gewinnung der Pyocinlösung erfolgte, wie oben beschrieben, durch Ausschütteln mit Chloroform (15 ml/100 ml Kulturbouillon) und anschließend Zentrifugieren bei 5000 x g für 10 Min.

#### 4.31 Pyocinreinigung

Zur Herstellung einiger Pyocin-Antisera und zur Durchführung diskoelektrophoretischer Untersuchungen wurden die Pyocinpräparationen im wesentlichen nach der Methode von HIGERD<sup>26</sup> hergestellt und nach folgendem Schema teilweise gereinigt:

Abb. 1



+ Rundschüttelmaschine, Modell RC4 A. Kühner, Basel

#### 4.32 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von LOWRY et al.<sup>54</sup> bestimmt<sup>+</sup>.

#### 4.4 Typisierung

##### 4.41 Titration der Pyocine

Die Titration der Pyocine und die Bestimmung des Lyse-spektrums erfolgte in Anlehnung an die Phagentypisierung von Staphylococcus aureus<sup>5</sup>. Die 21 Standard-Pyocine A-U wurden nach der Methode von FARMER und HERMAN<sup>16</sup> gewonnen. Zehn ml TSB in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben wurden mit einer Einzelkolonie eines Indikatorstammes beimpft und 2 Std. bei 32°C im Wasserbad unter ständigem Schütteln bebrütet. Ein ml dieser Lösung wurde auf vorher 48 Std. getrocknete TSA-Platten gebracht und mit einem Glasspatel auf der Agaroberfläche gleichmäßig verteilt. Nach Eintrocknen der Indikator-Suspension konnten die einzelnen Pyocinpräparationen in 10-fachen Verdünnungsstufen bis 10<sup>-6</sup> mit einem Typisiergerät<sup>++</sup> aufgetragen werden. Das Typisiergerät ermöglichte es, 21 Pyocinlösungen gleichzeitig aufzutropfen. Die Platten wurden 14 Std. bei 30°C bebrütet und anschließend beurteilt. Auf diese Weise war es möglich, für jedes der Standard-Pyocine A-U denjenigen Indikatorstamm zu ermitteln, auf dem das jeweilige Pyocin die höchste Konzentration erreichte. Die RTD war die höchste Verdünnungsstufe, bei der auf dem empfindlichsten Indikatorstamm noch eine konfluierende Lyse zu erkennen war. Die RTD-Werte wurden in Abständen von 8 Tagen wiederholt überprüft.

---

+ Zeiss Spektral-Photometer (M4:Q, III, 49080)  
Carl Zeiss, Oberkochen, Württemberg, Deutschland

++ Das Gerät wurde in Anlehnung an ein ähnliches Gerät des Institutes für Hygiene der Universität Göttingen in der Institutswerkstatt angefertigt.

#### 4.42 Lysespektrum der Pyocine

Zur Bestimmung des Lysespektrums wurden alle zur Typisierung verwendeten Pyocine in der RTD und in einer 100 x konzentrierteren Pyocinlösung (100 x RTD) auf die Bakterienrasen aller 27 Indikatorstämme aufgetragen. Auf diese Weise war es möglich, Pyocine mit identischem Lysespektrum zu ermitteln.

#### 4.43 Pyocin-Empfindlichkeit der Testkulturen

Zur Typisierung wurden die Pyocine nach der Methode von FARMER und HERMAN<sup>16</sup> gewonnen. Die Indikatorrasen von P. aeruginosa bereitete ich, wie oben beschrieben, vor. Als Indikatorstämme dienten die 91 zu untersuchenden Kulturen. Die Pseudomonadenstämme wurden zunächst mit den Pyocinen in der RTD typisiert, anschließend in der 100 x RTD.

Die auftretenden Reaktionen wurden wie folgt bezeichnet:

- + Konfluierende Lyse der Testkultur
- + Schwache Wachstumshemmung
- Keine Wachstumshemmung
- P Phagenreaktion

Durch die Verwendung der Pyocine in der RTD bzw. 100 x RTD waren Phagen-Reaktionen als stecknadelstichgroße Plaques eindeutig von den Pyocin-Reaktionen zu unterscheiden.

#### 4.44 Pyocin-Produktion der Testkulturen

Zur Vervollständigung der Typisierungsergebnisse wurden die 91 Testkulturen auf ihre Fähigkeit, Pyocine zu bilden, überprüft. Die Pyocine wurden auf die oben beschriebene Weise gewonnen und auf den 27 Indikatorstämmen getestet.

#### 4.5 Pyocin-Stabilität

Von den Standard-Pyocinen A-U wurde eine 10-fache Verdünnungsreihe bis zu der Verdünnungsstufe der jeweiligen RTD angelegt, und in sterilen Reagenzgläsern bei + 4°C aufbewahrt. Am Tage der Pyocingewinnung und an den folgenden 65 Tagen wurden die einzelnen Verdünnungsstufen der Pyocine in bestimmten Zeitabständen mit einer sterilen Öse auf ihren homologen Indikatorstamm aufgetragen und die Pyocin-Aktivität bestimmt.

#### 4.6 Charakterisierung einiger Pyocine

##### 4.61 Serologische Charakterisierung

##### 4.611 Herstellung der Pyocin-Antiseren

Kaninchen von 2-2,5 kg Körpergewicht wurden 5 mal intravenös im Abstand von jeweils 4 Tagen gespritzt. Dabei wurden bei der 1. Injektion 1 ml, bei der 2. 2 ml, bei der 3. 3 ml, bei der 4. 4 ml und bei der 5. Injektion 5 ml einer gereinigten Pyocinlösung injiziert. Die Injektionslösung enthielt pro ml 0,6 mg Protein. Eine Woche nach der letzten Injektion wurden die Antiseren durch Herzpunktion gewonnen.

##### 4.612 Bestimmung der Anti-Pyocin-Titer

Die Anti-Pyocin-Titer wurden sowohl mit den homologen als auch mit den heterologen Pyocinen in jeweils 10-fachen Verdünnungsreihen der Antiseren bis zu einer Verdünnung von  $10^{-4}$  in 0,14M NaCl bestimmt. Die weitere Verdünnung der Antiseren erfolgte dann in einer 2-fachen Verdünnungsreihe. Alle Pyocine waren in jedem Test auf 100 x RTD eingestellt.

#### 4.613 Bestimmung der Neutralisationskonstanten einiger Pyocine

In Anlehnung an die Phagentypisierung von Staphylokokken<sup>2</sup> wurde die Neutralisationskonstante (K) einiger Pyocine bestimmt. Diese diente bei der Phagentypisierung als Maßstab für die serologische Verwandtschaft zweier Phagen. Zunächst wurde der K-Wert der Antiseren mit den homologen Pyocinen ermittelt, anschließend erfolgte die Bestimmung der Neutralisationskonstanten mit den heterologen Pyocinen.

Der K-Wert wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$K = \frac{2,3 \times D}{t} \quad \log \frac{P_0}{P}$$

Dabei waren: t = Zeit in Min.

D = Reziproke Wert der Serumverdünnung

P<sub>0</sub> = Zahl der aktiven Pyocin-Einheiten  
zum Zeitpunkt t = 0

P = Zahl der aktiven Pyocin-Einheiten  
zum Zeitpunkt t

Diese Gleichung galt nur bei einer Inaktivierungsrate von 90 - 99 %. Aus diesem Grund mußte zunächst die Serumverdünnung ermittelt werden, die dieser Bestimmung entsprach. Es wurden nur Pyocine untersucht, die 1 RTD in einer Verdünnung von mindestens 10<sup>-4</sup> aufwiesen. Auf dieser Grundlage wurde einer solchen Lösung 10 000 Einheiten (E) Pyocin zugeschrieben. Ausgehend von einer Verdünnung von 1 : 10 wurden 2-fache Verdünnungsreihen bis 10<sup>-4</sup> angelegt und jede einzelne Verdünnungsstufe mit verschiedenen Antiserumverdünnungen im Wasserbad bei 37°C zusammengegeben. Unmittelbar nach dem Mischen der Antiseren mit den Pyocinverdünnungen und nach 10, 20 und 30 Min. wurde aus jedem Röhrchen mit einer sterilen Öse eine Probe entnommen und auf einem vorbereiteten Indikatorrasen aufgetragen.

Nach 14stündigem Bebrüten bei 30°C konnten die Platten beurteilt werden. Zur Feststellung der Neutralisation wurde der Mittelwert der zu den Zeitpunkten  $t = 0, 10, 20$  und  $30$  Min. festgestellten Neutralisationswerte bestimmt und gleich 100 % gesetzt ( $= P_0$  in der Gleichung). Die Neutralisation wurde auf diesen Mittelwert bezogen ( $= P$  in der Gleichung). Kontrollversuche wurden mit den entsprechenden Neutralseren durchgeführt. Die Berechnung des K-Wertes erfolgte mit der Serumverdünnung, welche die Pyocine innerhalb von 30 Min. ( $= t$  in der Gleichung) zu 90 - 99 % neutralisierte. Der K-Wert mit den heterologen Pyocinen wurde anschließend mit der gleichen Serumverdünnung ermittelt.

#### 4.62 Diskelektrophoretische Charakterisierung

##### 4.621 Vertikale Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese

Die vertikale Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese wurde im wesentlichen nach DAVIS<sup>13</sup>, SCHMITT<sup>71</sup> und BRÜCKLER et al.<sup>8</sup> durchgeführt. Die für die Herstellung der Gele verwendeten Stammlösungen wurden nach den Angaben von SCHMITT<sup>71</sup> zubereitet. Die Apparaturzusammenstellung entsprach derjenigen, die auch von MAURER<sup>56</sup> vorgeschlagen wurde. Die Polymerisation der Gele fand in 11 cm langen Glasröhrchen statt. Neben einem Trenngel mit einer Acrylamid-Konzentration von 5,25 % wurde ein solches mit einer Konzentration von 3,75 % verwendet. Die einzelnen Röhrchen wurden mit 0,3 ml eines mit Hilfe eines Druckfilter<sup>+</sup> eingeeengten Ammoniumsulfat-Präzipitates beschickt. Das entsprach einer Protein-Konzentration von 0,4 mg. Die Elektrophorese erfolgte in einem Tris (0,05 M) - Glykokoll (0,38 M) - Puffer, pH 8,5. Die Wanderungszeit betrug durchschnittlich 100 - 120 Min. Die Gelsäulchen wurden mit Amidoschwarz gefärbt und anschließend in 10 %iger Essigsäure auf einer Wippe entfärbt. Die Entfärbung dauerte 72 Std.

---

+ Sartorius-Membranfilter GmbH Göttingen

#### 4.622 Auswertung der Banden

Zum Nachweis der Pyocin-Banden wurden jeweils 2 Proben elektrophoretisch analysiert. Nach der Bestimmung der Gesamtwanderungsstrecke wurde ein Gelsäulchen mit Amidoschwarz gefärbt und das andere in 20 Teile zerschnitten. Jedes Teilstück wurde zu 0,1 ml physiologischer NaCl in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen von 8 ml gegeben, mit einem Glasstab homogenisiert und auf einen vorbereiteten Indikatorrasen mit einer Pasteur-Pipette aufgetropft.

## 5.0 Ergebnisse

### 5.1 Identifizierung der P. aeruginosa-Stämme

Alle 91 untersuchten Kulturen wurden aufgrund einer positiven Cytochromoxidase-Reaktion, einer positiven oxidativen Glucose-Spaltung und aufgrund der Fähigkeit, bei 42°C im GMAC-Agar zu wachsen, als P. aeruginosa identifiziert. Weiterhin waren alle untersuchten Testkulturen in der Lage, Pyocin zu bilden.

### 5.2 Typisierungsergebnisse

#### 5.21 Ermittlung der RTD

Die Pyocine A-U wurden in einer 10-fachen Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von  $10^{-6}$  auf sämtliche 27 Indikatorstämme aufgetragen. Dabei zeigte sich, daß die einzelnen Pyocine unterschiedliche Titer aufwiesen, wobei ihre Höhe von der Empfindlichkeit des jeweiligen Indikatorstammes abhing. Für die Pyocine A-E, G-J und U erwies sich der Indikatorstamm 5 am empfindlichsten. Für diese Pyocine wurde mit Ausnahme des Pyocin H eine RTD von  $10^{-4}$  festgestellt (Abb. 2). Beim Pyocin H entsprach die Verdünnung  $10^{-2}$  einer RTD.

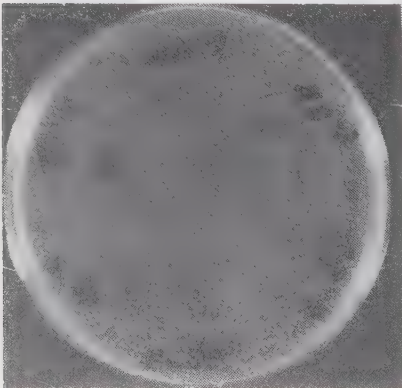


Abb. 2

Bestimmung der Routine-Test-Dilution (RTD) am Beispiel des Pyocins D auf P. aeruginosa-Indikatorstamm 5. Als RTD wurde die Pyocinverdünnung  $10^{-4}$  angesehen.

Die Pyocine K und L zeigten auf dem Indikatorstamm 13 in einer Verdünnung von  $10^{-2}$  noch eine konfluierende Lyse, während die Pyocine N, P, S und T auf dem gleichen Indikatorstamm einen RTD-Wert von  $10^{-3}$  aufwiesen. Die Pyocine F, O und P waren auf dem Indikatorstamm 9 am stärksten wirksam (RTD-Wert von  $10^{-3}$ ). Die Pyocine M und Q erreichten auf dem Indikatorstamm 4 den höchsten Titer ( $10^{-3}$  bzw.  $10^{-2}$ ).

#### 5.22 Lysespektrum der Pyocine

Die Standard-Pyocine A-U wurden in der RTD und in der 100 x RTD auf die Bakterienrasen aller 27 Indikatorstämme aufgetragen. Dabei nahm die Reaktionshäufigkeit der einzelnen Pyocine zu, je konzentrierter die Pyocinpräparation aufgetropft wurde. Waren die Lysebilder bestimmter Pyocine in der RTD noch nahezu identisch, so zeigten sich in der 100 x RTD erhebliche Unterschiede. Während z.B. das Lysebild des Pyocins A sich von dem des Pyocins B in der RTD nur durch eine Reaktion unterschied (Tab. 2), waren in der 100 x RTD 6 unterschiedliche Reaktionen festzustellen (Tab. 3). Das konnte im Hinblick auf die Typisierung bedeuten, daß Stämme, die in der RTD ein identisches Lysebild aufwiesen, sich in der 100 x RTD in ihrem Lysespektrum wesentlich unterschieden. Die Lysebilder bestanden in der RTD in der Regel aus 6 Reaktionen, während in der 100 x RTD durchschnittlich 13 Reaktionen festzustellen waren. Die Reaktionshäufigkeit war in der RTD am größten bei dem Pyocin F. Das Pyocin N lysierte in der RTD die wenigsten Indikatorstämme. Die Indikatorstämme 1-3, 7 und 8, 10, 12, 21 und 22 wurden in der RTD von keinem der 21 Standard-Pyocine lysiert. In der 100 x RTD zeigten alle Standard-Pyocine mit dem Indikatorstamm 1 eine negative Reaktion.

Tabelle 2

Lysespektren der Standard-Pyocine A-U in der RTD mit den Standard-Indikatorstämmen von P. aeruginosa

| Pyocine | Standard-Indikatorstämme |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|         | 1                        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| A       |                          |   |   | + |   |   |   | + |   |    |    |    |    |    |    | +  | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |
| B       |                          |   |   | + |   |   |   |   | + |    |    |    |    |    |    | +  | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |
| C       |                          |   |   | + |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    | +  | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |
| D       |                          |   |   | + |   |   |   | + |   | +  |    |    |    |    | +  |    | +  |    |    | +  |    |    |    |    |    |    | +  |
| E       |                          |   |   | + | + | + |   |   |   |    |    |    | +  |    |    | +  | +  | +  |    |    |    | +  |    |    | +  |    | +  |
| F       |                          |   |   | + | + | + |   | + |   |    |    |    | +  | +  |    | +  | +  |    |    |    |    | +  |    | +  |    |    | +  |
| G       |                          |   |   | + |   | + |   |   | + |    |    |    | +  | +  |    | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |
| H       |                          |   |   | + | + | + |   |   |   |    |    |    |    |    |    | +  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |
| I       |                          |   |   | + | + | + |   |   |   |    |    |    | +  |    |    |    | +  |    |    |    |    |    |    |    |    | +  | +  |
| J       |                          |   |   | + |   |   |   |   |   |    |    |    |    | +  |    |    | +  |    |    |    |    |    | +  |    |    |    | +  |
| K       |                          |   |   | + |   |   |   | + |   | +  |    |    | +  |    | +  |    |    |    |    |    |    | +  |    |    |    |    |    |
| L       |                          |   |   |   |   |   |   |   | + | +  |    | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |    |    |    |    |    |
| M       |                          |   |   | + |   |   |   | + |   | +  |    | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |    |    |    |    |    |
| N       |                          |   |   |   |   |   |   |   | + | +  |    | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |    |    |    |    |    |
| O       |                          |   |   |   |   |   |   | + |   | +  |    | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |    |    |    |    |    |
| P       |                          |   |   |   |   |   |   |   | + | +  |    | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Q       |                          |   |   | + |   |   |   |   |   | +  |    | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| R       |                          |   |   | + |   |   |   | + |   | +  |    | +  | +  |    |    | +  |    |    |    |    |    | +  |    |    |    |    |    |
| S       |                          |   |   | + |   |   |   | + |   | +  |    | +  | +  |    | +  |    |    |    | +  |    |    |    |    |    |    |    |    |
| T       |                          |   |   |   |   |   |   | + |   |    |    | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| U       |                          |   |   | + |   |   |   | + | + | +  |    | +  | +  |    |    | +  | +  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | +  |

+ Konfluierende Lyse

Tabelle 3

Lysspektren der Standard-Pyocine A-U in der 100 x RTD mit den Standard-Indikatorstämmen von P. aeruginosa

| Pyocine | Standard-Indikatorstämme |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|         | 1                        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| A       | +                        |   |   |   | + | + |   |   | + |    |    |    |    | +  |    | +  |    | +  |    |    |    | +  |    |    | +  |    | +  |
| B       |                          |   |   | + | + | + |   | + |   | +  |    |    |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    |    | +  |    | +  |    | +  |
| C       |                          |   |   | + |   | + |   | + |   |    |    |    |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| D       |                          |   |   | + | + | + |   | + |   |    |    |    |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| E       | +                        |   |   |   | + | + |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| F       | +                        | + |   | + | + | + |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| G       | +                        | + |   | + | + | + |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| H       | +                        | + |   | + | + | + |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| I       | +                        | + |   | + | + | + |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| J       |                          |   |   | + | + |   |   |   | + |    |    |    |    | +  |    | +  |    | +  |    |    | +  |    |    |    | +  |    | +  |
| K       |                          | + | + |   |   |   |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| L       |                          | + | + |   |   |   |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| M       |                          | + | + |   |   |   |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| N       |                          | + | + |   |   |   |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| O       |                          | + |   |   |   |   |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| P       |                          | + |   |   |   |   | + |   | + | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| Q       |                          | + |   |   |   |   |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  |
| R       |                          |   |   |   |   |   | + |   | + |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  | +  | +  |    | +  | +  |
| S       |                          |   |   |   |   |   |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  | +  |    | +  | +  |
| T       |                          | + | + |   |   |   |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  | +  |    | +  | +  |
| U       |                          | + | + | + | + | + |   | + |   | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  | +  |    | +  | +  |

+ Konfluierende Lyse

### 5.23 Pyocin-Empfindlichkeit der Testkulturen

Die Empfindlichkeit der 91 Testkulturen gegenüber den Standard-Pyocinen wurde in der RTD und in der 100 x RTD geprüft (Tab. 4). Dabei war zu beobachten, daß 41 Testkulturen von keinem der Standard-Pyocine in der RTD lysiert wurden, während 5 Testkulturen mit einer durchgehend positiven Reaktion ein identisches Lysespektrum aufwiesen. Die Kulturen 129, 158 und 180 zeigten in der RTD ebenfalls ein identisches Lysespektrum. In der 100 x RTD (Tab. 5) war bei diesen Kulturen hingegen keine vollständige Übereinstimmung in ihren Reaktionsbildern festzustellen. Durchgehend positive Reaktionen wurden in der 100 x RTD bei insgesamt 15 Kulturen beobachtet. Zehn dieser Kulturen hatten aber in der RTD ein unterschiedliches Lysebild. Weiterhin konnten in der 100 x RTD 22 Stämme in kleinere Gruppen mit identischem Lysespektrum eingeteilt werden. Von insgesamt 37 Kulturen, die in der 100 x RTD eine Übereinstimmung in ihren Lysebildern aufwiesen, hatten nur 5 Stämme in der RTD ebenfalls ein identisches Lysebild.

Durch die Anwendung der Pyocine in der RTD und in der 100 x RTD konnte somit gezeigt werden, daß einzelne Stämme, deren Reaktionsbilder in einer der beiden Verdünnungsstufen identisch waren, in der anderen Verdünnungsstufe unterschiedliche Reaktionen aufwiesen.

Tabelle 4

Empfindlichkeit der Testkulturen von P. aeruginosa gegen die Standard-Pyocine A-U in der RTD

| Test-<br>Kulturen<br>als Indik. | Standard-Pyocine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 | A                | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T |
| 52                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 53                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 57                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 58                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 59                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 62                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 67                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 69                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 72                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 74                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 75                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 77                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 78                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 79                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 80                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 81                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 83                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 84                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 87                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Fortsetzung der Tabelle 4

| Test-<br>Kulturen<br>als Indik. | Standard-Pyocine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 | A                | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T |
| 88                              | -                | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 89                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 92                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 93                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 94                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 95                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 97                              | -                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 103                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 111                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 116                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 117                             | -                | - | - | - | - | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 122                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 129                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 130                             | +                | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 131                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 134                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 137                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 138                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 139                             | -                | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 151                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 152                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Fortsetzung der Tabelle 4

| Test-<br>Kulturen<br>als Indik. | Standard-Pyocine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 | A                | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P |
| 153                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 154                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 155                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 156                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 157                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 158                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 159                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 160                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 161                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 162                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 163                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 164                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 165                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 166                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 167                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 168                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 169                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 170                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 171                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 172                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

| Test-<br>Kulturen<br>als Indik. | Standard-Pyocine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 | A                | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P |
| 173                             | +                | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | + | + | + | + |
| 174                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 175                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 176                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 179                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 180                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 181                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 182                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 183                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 184                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + | + |
| 186                             | -                | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 187                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 188                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + | + |
| 189                             | -                | - | - | - | - | - | + | - | + | + | - | - | + | P | + | + |
| 190                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 194                             | -                | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 196                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 197                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 200                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 207                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

| Test-<br>Kulturen<br>als Indik. | Standard-Pyocine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 | A                | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T |
| 213                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 214                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 216                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 255                             | +                | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | + | - | + | - | - |
| 262                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 272                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | P | - | - | - | - | - | - |
| 281                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 290                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 291                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 296                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Zeichenerklärung:

- + Konfluierende Lyse
- ± Schwache Wachstumshemmung
- Keine Wachstumshemmung
- P Phagenreaktion

Tabelle 5

Empfindlichkeit der Testkulturen von P. aeruginosa gegen die Standard-Pyocine A-U in der 100 x RTD

| Test-<br>Kulturen<br>als Indik. | Standard-Pyocine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 | A                | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T |
| 52                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 53                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 57                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - |
| 58                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - |
| 59                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 62                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - |
| 64                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 67                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 69                              | -                | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 72                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - |
| 74                              | -                | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 75                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 77                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 78                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 79                              | -                | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 80                              | +                | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 81                              | -                | - | - | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 83                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 84                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 87                              | -                | - | + | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

Fortsetzung der Tabelle 5 auf Seite 35

| Test-<br>Kulturen<br>als Indik. | Standard-Pyocine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 | A                | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T |
| 88                              | -                | - | - | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 89                              | -                | - | - | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 92                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 93                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 94                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 95                              | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 97                              | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 103                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 111                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 116                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 117                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 122                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 129                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 130                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 131                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 134                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 137                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 138                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 139                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 151                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Fortsetzung der Tabelle 5

| Test-<br>Kulturen<br>als Indik. | Standard-Pyocine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 | A                | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T | U |
| 152                             | -                | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + |
| 153                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 154                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 155                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 156                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 157                             | -                | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 158                             | +                | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 159                             | -                | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 160                             | -                | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 161                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 162                             | +                | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 163                             | +                | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 164                             | +                | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 165                             | -                | - | - | - | + | + | P | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 166                             | -                | - | - | - | - | - | P | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 167                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 168                             | -                | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 169                             | +                | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 170                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 171                             | -                | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Fortsetzung der Tabelle 5 auf Seite 37

Fortsetzung der Tabelle 5

| Test-<br>Kulturen<br>als Indik. | Standard-Pyocine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 | A                | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T |
| 172                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 173                             | +                | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 174                             | -                | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 175                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 176                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 179                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 180                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 181                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 182                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 183                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 184                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 186                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 187                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 188                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 189                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 190                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 194                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 196                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 197                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 200                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Fortsetzung der Tabelle 5 auf Seite 38

Fortsetzung der Tabelle 5

| Test-<br>Kulturen<br>als Indik. | Standard-Pyocine |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                 | A                | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T | U |
| 207                             | +                | - | - | + | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 213                             | -                | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 214                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 216                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| 255                             | +                | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| 262                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 272                             | +                | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | P | + | + | + | + | + | + | + |
| 281                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 290                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 293                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 296                             | -                | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Zeichenerklärung:  
 + Konfluierende Lyse  
 + Schwache Wachstumshemmung  
 - Keine Wachstumshemmung  
 P Phagenreaktion

#### 5.24 Reaktionshäufigkeit der einzelnen Standard-Pyocine

Die Reaktionshäufigkeit der einzelnen Standard-Pyocine in der RTD und in der 100 x RTD wurde in Abb. 3a und b dargestellt. Dabei zeigte sich, daß das Pyocin F mit 37 Kulturen (40,7 %) in der RTD die meisten Stämme lysierte, während das Pyocin Q mit 17 Kulturen (18,6 %) die geringste Reaktionshäufigkeit aufwies. In der 100 x RTD hatte das Pyocin L die höchste Typisierungsrate (58 Kulturen = 63,7 %). Die wenigsten positiven Reaktionen wurden in der 100 x RTD bei dem Pyocin I beobachtet (32 Kulturen = 35,4 %). Wurde die Reaktionshäufigkeit der einzelnen Pyocine in der RTD mit der Breite ihres Lysespektrums auf den 27 Standard-Indikatorstämmen verglichen, so ergab sich, daß Pyocine mit einem relativ engen Lysespektrum auch eine geringere Reaktionshäufigkeit aufwiesen. Alle Standard-Pyocine besaßen auf den 91 Testkulturen ein unterschiedliches Lysespektrum.

Abb. 3a  
Reaktionshäufigkeit der Standard-Pyocine  
mit den 91 Testkulturen von P. aeruginosa

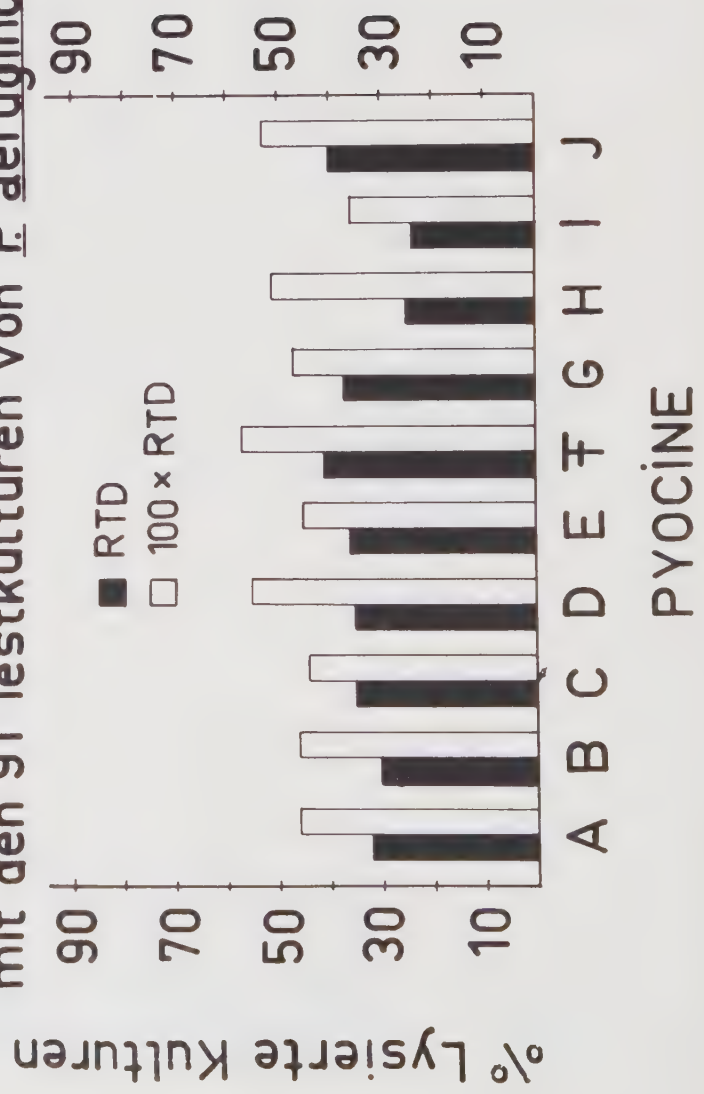
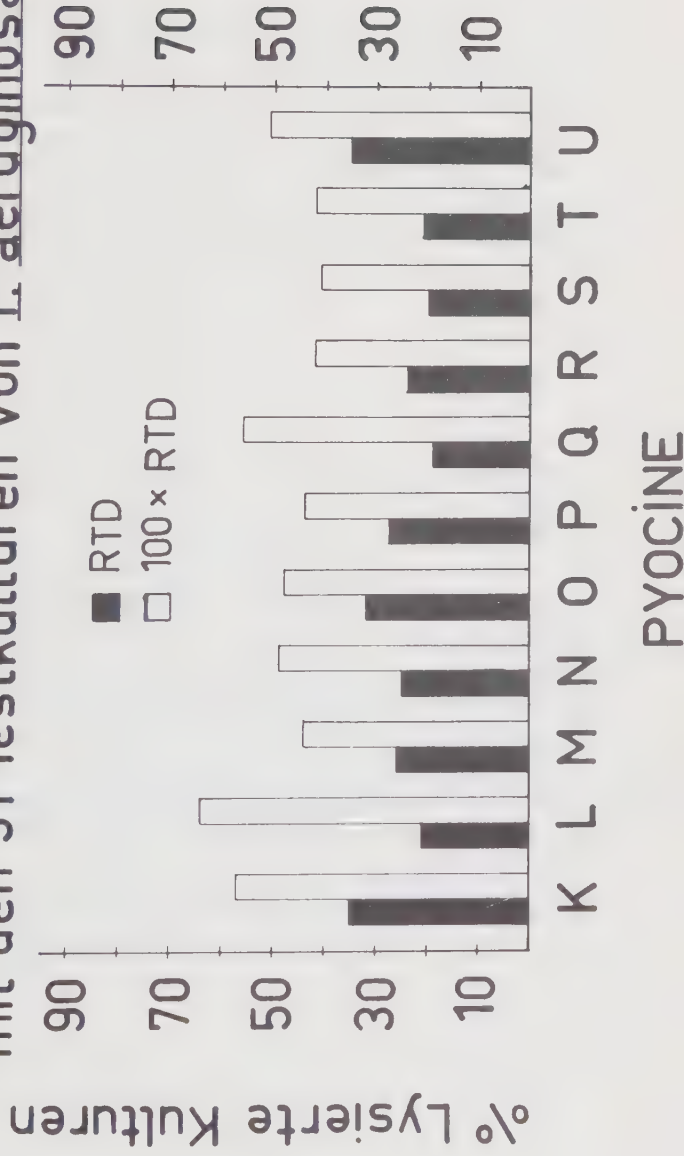


Abb. 3b

Reaktionshäufigkeit der Standard-Pyocine  
mit den 91 Testkulturen von P. aeruginosa



## 5.25 Typisierbarkeit der Pseudomonaden-Kulturen

Von den 91 Testkulturen waren in der RTD 50 (54,9 %) typisierbar, in der 100 x RTD 76 (83,5 %) (Tab. 6). Die Mehrzahl der in der RTD bzw. in der 100 x RTD nicht typisierbaren Kulturen waren aus Untersuchungsmaterial vom Menschen isoliert worden. Von 49 Kulturen vom Menschen zeigten in der RTD nur 21 (42,9 %) mit mindestens einem der Pyocine eine positive Reaktion, und in der 100 x RTD 36 (73,5 %). Von den 42 Kulturen tierischer Herkunft waren in der RTD 29 (69 %) und mit der 100 x RTD 40 (95,2 %) typisierbar.

Tabelle 6

Typisierbarkeit der untersuchten Pseudomonaden-Kulturen

|                          | Herkunft |      | insges. |
|--------------------------|----------|------|---------|
|                          | Mensch   | Tier |         |
| Zahl                     | 49       | 42   | 91      |
| Typisierbar              |          |      |         |
| RTD                      | 21       | 29   | 50      |
| %                        | 42,9     | 69   | 54,9    |
| Typisierbar              |          |      |         |
| 100 x RTD                | 36       | 40   | 76      |
| %                        | 73,5     | 95,2 | 83,5    |
| Nicht-Typisierbare Kult. | 13       | 2    | 15      |
| %                        | 28,6     | 4,8  | 16,5    |

## 5.26 Pyocin-Produktion der Testkulturen

Zur Vervollständigung der Typisierungsergebnisse wurden von allen Testkulturen nach der Methode von FARMER und HERMAN<sup>16</sup> Pyocine gewonnen und auf die 27 Indikatorstämme aufgetragen. Zunächst kamen alle Pyocinpräparationen in unverdünnter Form zur Anwendung. Hierbei stellte sich heraus, daß die Reaktionsbilder einzelner Pyocine untereinander identisch waren (Tab. 7). Die Kulturen 57, 58, 62 und 72 stimmten in ihren Lysebildern überein, ebenso die Kulturen 95, 111, 281 und 296, 200 und 262, 189 und 190, 172 und 175. Kamen die Pyocine in einer Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$  zur Anwendung, so zeigte sich, daß die Kulturen 200 und 262 in ihren Lysebildern nicht mehr übereinstimmten. Der Stamm 165 hatte in dieser Verdünnungsstufe mit den Kulturen 57, 58, 62 und 72 ein korrespondierendes lytisches Muster, während sein Reaktionsbild in der unverdünnten Pyocinpräparation mit dem jener Stämme nicht übereinstimmte. In der Verdünnungsstufe  $10^{-3}$  war eine Übereinstimmung im Lysebild nur noch festzustellen bei den Kulturen 57, 62, 72 und 165, 95 und 296 und 189 und 190. Waren die Lysebilder einzelner Stämme in allen 3 Verdünnungsstufen identisch, so konnte davon ausgegangen werden, daß es sich um gleiche Pyocin-Typen handelte. Dies traf für die Stämme 57, 62 und 72, 95 und 296 und 189 und 190 zu. Auch bei der Pyocin-Produktion der Testkulturen konnte somit festgestellt werden, daß eine Diskrepanz bestand zwischen den Lysebildern einzelner Pyocine in unverdünnter Form und denen, die mit verdünnten Pyocinpräparationen ermittelt wurden.

Tabelle 7

Pyocin-Produktion der Testkulturen von P. aeruginosa

| Pyocin<br>produz.<br>Testkult. | Standard-Indikatorstämme |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------------------------|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                | 1                        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| 52                             | -                        | - | - | - | - | + | + | - | + | -  | -  | -  | +  | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  |
| 53                             | -                        | + | - | - | + | + | + | - | - | -  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 57                             | -                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 58                             | -                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 59                             | -                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 62                             | -                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 64                             | -                        | - | - | - | - | - | + | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 67                             | +                        | - | + | - | + | + | + | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 69                             | +                        | - | + | + | + | + | + | - | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 72                             | -                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 74                             | -                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 75                             | +                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 77                             | -                        | + | - | - | - | + | + | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 78                             | -                        | - | - | - | - | + | + | - | + | -  | +  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 79                             | +                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 80                             | -                        | + | - | + | + | + | + | + | - | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 81                             | +                        | + | + | + | + | + | + | + | - | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 83                             | -                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 84                             | +                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 87                             | -                        | + | - | - | + | + | + | - | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |

Fortsetzung der Tabelle 7 auf Seite 45

| Pyocin<br>produz.<br>Testkult. | Standard-Indikatorstämme |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------------------------|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                | 1                        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| 88                             | -                        | + | + | + | + | + | + | - | + | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 89                             | -                        | + | + | + | + | + | + | - | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 92                             | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 93                             | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 94                             | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 95                             | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 97                             | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 103                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 111                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 116                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 117                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 122                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 129                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 130                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 131                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 134                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 137                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 138                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 139                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 151                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |

Fortsetzung der Tabelle 7

| Pyocin<br>produz.<br>Testkult. | Standard-Indikatorstämme |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------------------------|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                | 1                        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| 152                            | -                        | + | - | + | + | + | + | - | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 153                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | +  | +  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  |
| 154                            | +                        | - | - | + | - | + | + | + | + | -  | +  | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 155                            | -                        | - | - | + | + | + | + | + | + | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  |
| 156                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | -  | +  | -  | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 157                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | -  | +  | -  | -  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 158                            | -                        | - | + | + | + | + | + | + | + | -  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 159                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | +  | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 160                            | -                        | + | - | - | - | + | + | + | + | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 161                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | -  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 162                            | -                        | - | + | - | - | + | + | + | + | -  | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 163                            | -                        | - | - | + | + | + | + | + | + | -  | +  | -  | -  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 164                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | -  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 165                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 166                            | +                        | + | - | + | + | + | + | + | + | +  | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 167                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | -  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 168                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 169                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 170                            | -                        | - | - | - | - | + | + | + | + | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  |
| 171                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |

Fortsetzung der Tabelle 7 auf Seite 47

| Pyocin<br>produz.<br>Testkult. | Standard-Indikatorstämme |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------------------------|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                | 1                        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| 172                            | -                        | + | - | + | + | + | - | + | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |
| 173                            | -                        | - | - | + | + | - | + | + | + | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | +  |
| 174                            | -                        | - | - | + | + | + | - | + | + | -  | -  | -  | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  |
| 175                            | -                        | + | - | + | + | + | - | + | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  |
| 176                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 179                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 180                            | +                        | - | - | + | + | + | - | + | + | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  |
| 181                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  |
| 182                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 183                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 184                            | -                        | - | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 186                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 187                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 188                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 189                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 190                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 194                            | +                        | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 196                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 197                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 200                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |

Fortsetzung der Tabelle 7

| Pyocin<br>produz.<br>Testkult. | Standard-Indikatorstämme |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------------------------|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                | 1                        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| 207                            | -                        | - | ± | + | + | - | + | + | + | -  | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | ±  | +  | -  | -  | +  | +  |
| 213                            | -                        | - | ± | + | + | - | + | + | + | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | ±  | +  | -  | -  | -  | -  |
| 214                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | +  | +  | ±  | +  | -  | +  |
| 216                            | -                        | - | + | - | - | + | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 255                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | -  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 262                            | -                        | + | - | + | + | + | + | + | + | -  | -  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 272                            | -                        | - | + | - | + | - | + | + | + | -  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| 281                            | +                        | + | + | + | + | + | + | + | + | -  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 290                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | ±  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 293                            | -                        | + | + | + | + | + | + | + | + | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | +  | -  | +  | -  | +  | +  | ±  | +  | +  | +  | +  |
| 296                            | ±                        | + | + | + | + | + | + | + | + | -  | -  | -  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |

Zeichenerklärung:

- + Konfluierende Lyse
- ± Schwache Wachstumshemmung
- Keine Wachstumshemmung
- P Phagenreaktion

### 5.27 Bestimmung identischer Stämme

Durch Kombination der Pyocin-Empfindlichkeit und der Pyocin-Produktion der Testkulturen wurde die Identität einzelner Stämme ermittelt. Dabei wurde eine Identität nur dann angenommen, wenn die Ergebnisse zweier Kulturen in allen Verdünnungsstufen beider Typisierungskriterien übereinstimmten. Die Kulturen 64, 75, 83, 151 und 190 wiesen in ihrer Pyocin-Empfindlichkeit sowohl in der RTD als auch in der 100 x RTD übereinstimmende Reaktionsbilder auf. Mit der Pyocin-Produktionsmethode war jedoch keine Übereinstimmung in den Lysebildern festzustellen, so daß diese Kulturen nicht als identisch anzusehen waren. Die Kulturen 67 und 72 und 189 und 190, die jeweils dem gleichen Pyocin-Typ zuzuordnen waren, besaßen auch in der 100 x RTD ein übereinstimmendes Pyocin-Empfindlichkeitsmuster. In der RTD bestand diese Übereinstimmung jedoch nicht. Nach einem solchen strengen Maßstab war keine der untersuchten Pseudomonaden-Kulturen mit einer anderen identisch.

### 5.3 Pyocinstabilität

Die Stabilität der 21 Standard-Pyocine in der RTD wurde über einen Zeitraum von 65 Tagen auf denjenigen Indikatorstämmen geprüft, die auch zur Ermittlung der RTD benutzt worden waren. Hierbei war festzustellen, daß nach insgesamt 9 Probenentnahmen im Abstand von 5 Tagen, später im Abstand von 10 Tagen, bei 12 Pyocinen während des gesamten Prüfungszeitraums kein Abfall der Aktivität registriert werden konnte. Die Pyocine A und E waren in ihrer Aktivität 15 Tage unverändert und zeigten nach insgesamt 65 Tagen einen Rückgang um 2 bzw. 3 Verdünnungsstufen der 10-fachen Verdünnungsreihe. Die Pyocine B und C wiesen über einen Zeitraum von 20 Tagen keinen Aktivitätsverlust auf. Der Titerabfall betrug am Ende des Prüfungszeitraums ebenfalls 2 bzw. 3 Verdünnungsstufen. Bei den Pyocinen D und H war eine Verringerung der Aktivität um 1 Verdünnungsstufe zu beobachten, ebenso bei den Pyocinen M, Q und U.

#### 5.4 Pyocinreinigung

Durch die 2-fache Ausfällung von Pyocin aus dem Chloroform-Kulturüberstand mit jeweils 20 % und 30 %igem Ammoniumsulfat konnte ein erster Reinigungseffekt erzielt werden. Während der Chloroform-Kulturüberstand eine spezifische Aktivität von 1700 E/mg Protein aufwies (Tab. 8), wurde für das 1. Ammoniumsulfat-Präzipitat eine spezifische Aktivität von 83920 E/mg Protein, für das 2. Ammoniumsulfat-Präzipitat eine solche von 141671 E/mg Protein nachgewiesen. Dies entsprach einem Reinigungsfaktor von 4,9 für das 1. Präzipitat und von insgesamt 8,3 für das 2. Präzipitat. Der Verlust an Gesamtaktivität der auf diese Weise gewonnenen konzentrierten Pyocinlösung betrug gegenüber dem Chloroformüberstand 60 %.

Durch diese Anreicherungsmethode wurden 8 weitere Pyocine zur Gewinnung von Pyocin-Antisera hergestellt.

Tabelle 8

Zusammenfassung der Reinigungsergebnisse vom Pyocin des Stammes G

|                                        | Akt./ml | Gesamtakt.         | Prot./ml | Spez. Akt. <sup>+</sup> | Ausbeute | Rein. Fakt. |
|----------------------------------------|---------|--------------------|----------|-------------------------|----------|-------------|
| Chloroform-Kulturüberst. <sup>++</sup> | 16.000  | $6,1 \times 10^6$  | 0,9375   | 17.000                  | -        | -           |
| 1. Präzipitat<br>(20 %)                | 128.000 | $2,56 \times 10^6$ | 1,5375   | 83.920                  | 40 %     | 4,9         |
| 2. Präzipitat<br>(30 %)                | 128.000 | $2,56 \times 10^6$ | 0,935    | 141.671                 | 40 %     | 8,3         |

<sup>+</sup> Ausgedrückt in E Pyocin/mg Protein

<sup>++</sup> Ausgangsvolumen 400 ml

## 5.5 Charakterisierung einiger Pyocine

### 5.51 Serologische Charakterisierung

#### 5.511 Bestimmung der Anti-Pyocin-Titer

Die Antiseren gegen die Pyocine A-E, G, I und J wurden zur Ermittlung ihres Antikörpertiters zunächst in gleichen Mengen mit ihren homologen Pyocinen zusammengegeben, wobei die Pyocinlösung in einer Verdünnungsstufe zur Anwendung kam, die der 100 x RTD entsprach (Tab. 9). Die Antiseren gegen die Pyocine A und G wiesen mit 1 : 40.000 den höchsten Titer auf. Das Antiserum gegen das Pyocin E hatte einen Titer von 1 : 20.000 und die Antiseren gegen die Pyocine D, J, I, B und C einen solchen von 1 : 10.000 bzw. 1 : 1000. Die Anti-Pyocin-Titer waren mit den heterologen Pyocinen teilweise höher als mit den homologen, wobei die Unterschiede 1 bzw. 2 Verdünnungsstufen betrugen (Tab. 9). Auffallend war, daß das Antiserum gegen das Pyocin G mit allen heterologen Pyocinen einen gleich hohen oder höheren Titer aufwies als diese Pyocine mit ihren homologen Antiseren.

Tabelle 9

Anti-Pyocin-Titer<sup>+</sup> der Antiseren mit den homologen und heterologen Standard-Pyocinen

| Pyocine <sup>++</sup> | Antiseren gegen die Pyocine |        |       |        |        |        |        |        |
|-----------------------|-----------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                       | A                           | B      | C     | D      | E      | G      | I      | J      |
| A                     | 40.000                      | 1.000  | 1.000 | 10.000 | 20.000 | 40.000 | 10.000 | 1.000  |
| B                     | 40.000                      | 1.000  | 1.000 | 1.000  | 20.000 | 40.000 | 1.000  | 1.000  |
| C                     | 80.000                      | 10.000 | 1.000 | 1.000  | 80.000 | 40.000 | 1.000  | 1.000  |
| D                     | 10.000                      | 100    | 100   | 10.000 | 1.000  | 40.000 | 1.000  | 10.000 |
| E                     | 40.000                      | 1.000  | 1.000 | 1.000  | 20.000 | 40.000 | 40.000 | 10.000 |
| G                     | 40.000                      | 1.000  | 1.000 | 1.000  | 10.000 | 40.000 | 1.000  | 1.000  |
| I                     | 10.000                      | 100    | 100   | 1.000  | 1.000  | 20.000 | 10.000 | 1.000  |
| J                     | 20.000                      | 1.000  | 100   | 1.000  | 10.000 | 40.000 | 10.000 | 10.000 |

+ Kehrwerte der höchsten Serumverdünnungen, bei der eine vollständige Neutralisation der Pyocinaktivität erzielt wurde.

++ Alle Pyocine waren auf 100 x RTD eingestellt.

### 5.512 Die Neutralisationskonstanten einiger Standard-Pyocine

Wie schon aus der Tabelle 9 zu ersehen war, neutralisierten alle untersuchten Antiseren mit unterschiedlichen Titern neben den homologen auch die heterologen Pyocine. Diese Tatsache fand auch ihren Ausdruck in der Höhe der ermittelten Neutralisationskonstanten (Tab. 10). Dabei waren unter den K-Werten der einzelnen Pyocine Unterschiede festzustellen, die es ermöglichten, aufgrund des Verhältnisses zwischen dem K-Wert eines Antiserums mit dem homologen und heterologen Pyocin eine Aussage über die serologische Beziehung der Pyocine untereinander zu machen. Bei der Ermittlung der K-Werte mit den homologen Pyocinen ergab sich, daß das Pyocin G den höchsten Wert aufwies, während das Pyocin A mit dem Pyocin E und die Pyocine B, I und J jeweils identische Neutralisationskonstanten hatten. Eine besonders enge serologische Beziehung zwischen 2 Pyocinen wurde dann angenommen, wenn der Wert der heterologen Neutralisationskonstanten gleich oder höher war als der der homologen. Dies mußte für beide Pyocine bzw. Antiseren gleichermaßen zutreffen. Der Wert der Neutralisationskonstanten des Antiserums G mit dem heterologen Pyocin C war höher als mit dem homologen Pyocin. Andererseits hatte das Antiserum C mit dem heterologen Pyocin G ebenfalls einen höheren K-Wert als mit dem homologen Pyocin. Ähnlich waren die Verhältnisse zwischen den Pyocinen C und E sowie I und J. Das Antiserum G hatte zwar mit dem heterologen Pyocin E den gleichen K-Wert wie mit dem homologen Pyocin, die Neutralisationskonstante des Antiserums E mit dem heterologen Pyocin G lag aber deutlich unter dem K-Wert des homologen Pyocins. Dies traf auch für das Antiserum A und die Pyocine C und E, die Antiseren I und J und das Pyocin E, das Antiserum B und die Pyocine C und E, sowie das Antiserum D und das Pyocin A zu.

Verhältnismäßig niedrigere Werte ergaben sich zwischen dem Antiserum C und den Pyocinen D und J und umgekehrt, ebenso zwischen dem Antiserum I und den Pyocinen B und C. Aufgrund dieser Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß zwischen den Pyocinen C und G, den Pyocinen C und E sowie zwischen den Pyocinen I und J relativ enge serologische Beziehungen bestanden. Die serologische Verwandtschaft war weniger eng zwischen den Pyocinen C, D und J, ebenso zwischen den Pyocinen B, C und I. Ein Zusammenhang zwischen den Reaktionsbildern der Pyocine mit den Testkulturen und ihrer serologischen Verwandtschaft untereinander bestand nicht.

Tabelle 10

Die Neutralisationskonstanten der Antiseren mit den homologen und heterologen Pyocinen

| Pyocine | Antiseren gegen die Pyocine |       |       |       |       |       |       |       |
|---------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         | A                           | B     | C     | D     | E     | G     | I     | J     |
| A       | 4.040                       | 1.570 | 785   | 1.012 | 2.315 | 6.290 | 1.570 | 1.570 |
| B       | 3.150                       | 2.020 | 801   | 266   | 1.748 | 3.490 | 532   | 1.512 |
| C       | 4.800                       | 2.395 | 1.010 | 435   | 7.450 | 9.590 | 532   | 1.570 |
| D       | 2.310                       | 534   | 229   | 1.010 | 1.330 | 7.825 | 1.570 | 2.020 |
| E       | 4.800                       | 2.020 | 1.199 | 793   | 4.040 | 8.080 | 3.300 | 2.855 |
| G       | 2.310                       | 1.565 | 1.013 | 576   | 1.748 | 8.080 | 1.031 | 1.595 |
| I       | 1.920                       | 872   | 436   | 785   | 1.748 | 6.400 | 2.020 | 2.020 |
| J       | 2.620                       | 1.154 | 800   | 576   | 3.140 | 3.490 | 2.020 | 2.020 |

## 5.52 Diskelektrophoretische Untersuchungen

Unter Berücksichtigung des hohen Molekulargewichts der Pyocine war anzunehmen, daß eine diskelektrophoretische Charakterisierung mit Hilfe eines 5,75 %igen Trenngels nicht möglich war. Dies wurde durch die Untersuchungen bestätigt. Es trat zwar im unteren Wanderungsbereich bei 73 eine markante Bande auf, die aber nicht als Pyocinbande identifiziert werden konnte. In diesem Wanderungsbereich war keine Pyocinaktivität festzustellen. Hingegen konnte eine deutliche Aktivität im sog. Probengel nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen mit einem 3,75 %igen Trenngel wiederholt. Nach MAURER<sup>56</sup> sollten bei dieser Polyacrylamidkonzentration Proteine bis zu einem Molekulargewicht von max.  $2 \times 10^6$  in das Trenngel einwandern können. Bei diesen Versuchen trat eine weitere markante Bande bei 67 auf. Auch diese Bande konnte nicht als Pyocinbande identifiziert werden. Die Pyocinaktivität war wiederum nur im Probengel nachzuweisen. Eine weitere Herabsetzung der Polyacrylamidkonzentration erwies sich als nicht zweckmäßig, da die Gelsäulchen wegen ihrer nunmehr weicherer Konsistenz nicht mehr unbeschädigt aus dem Glasröhrchen gewonnen werden konnten. Diese Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß es den Pyocinen aufgrund ihres hohen Molekulargewichts oder ihrer spezifischen Struktur nicht möglich war, in das Trenngel einzuwandern. Eine Charakterisierung mit Hilfe der vertikalen Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese gelang daher nicht.

## 6.0 Diskussion

Zur Typisierung von P. aeruginosa durch Pyocine kamen bisher vor allem 2 Methoden<sup>19,63</sup> zur Anwendung, die darauf basierten, daß einmal die Pyocin-Empfindlichkeit der Testkultur und zum anderen ihr Pyocin-Produktionsvermögen als Typisierungskriterium herangezogen wurde. Ein weiteres Typisierungsverfahren beruhte auf der Kombination dieser beiden Methoden<sup>16</sup>. Um nun die Typisierungsergebnisse verschiedener Laboratorien vergleichen zu können, erschien es erforderlich, durch quantitative Bestimmungen die verwendeten Pyocine auf eine einheitliche Basis zu stellen und somit zu einer Standardisierung der Pyocintypisierungsverfahren zu gelangen. In Anlehnung an die Phagentypisierung von S. aureus<sup>5</sup> wurden 21 Standard-Pyocine auf ihren homologen Indikatorstämmen auf 1 RTD und auf 100 x RTD eingestellt. Diese Untersuchungen machten deutlich, daß die Standard-Pyocine erhebliche Unterschiede in ihrer Konzentration aufwiesen (RTD-Werte zwischen  $10^{-2}$  und  $10^{-4}$ ), so daß bei Verwendung der Pyocine in unverdünnter Form keine vergleichbaren Bedingungen gegeben waren. Die Bestimmung der Lysespektren der 21 Standard-Pyocine in der RTD und in der 100 x RTD auf den Standard-Indikatorstämmen führte zu einer ersten Charakterisierung der Pyocine, was eine wesentliche Voraussetzung für eine Standardisierung darstellte. Aufgrund der Lysespektren sollten Pyocine mit identischem lytischem Muster ermittelt werden, wobei Pyocine mit gleichen Reaktionsbildern bei der weiteren Typisierung unberücksichtigt blieben. Die Lysespektren der Pyocine auf den Standard-Indikatorstämmen machten deutlich, daß die Häufigkeit der Pyocinreaktionen abhängig war von der Konzentration, mit der die Pyocine aufgetragen wurden. Aus diesem Grund war ein Vergleich der Typisierungsergebnisse einzelner Pyocine nur möglich, wenn von gleichen RTD-Werten ausgegangen wurde. Aus den Lysebildern der verwendeten Standard-Pyocine ging weiterhin hervor, daß in der RTD 9 der 27 Indikatorstämme von keinem der Standard-Pyocine lysiert wurde, während in der 100 x RTD 1 Indikatorstamm eine durchgehend negative Reaktion zeigte.

Diese Untersuchungsergebnisse mußten bei der späteren Typisierung die Typisierungsrate in der RTD dahingehend beeinflussen, daß alle Testkulturen, die den nicht erfaßten Indikatorstämmen entsprachen, in der RTD nicht typisiert werden konnten. Daher wäre es notwendig, durch Auswahl geeigneter Pyocinbildner die 21 Standard-Pyocine zu erweitern, um die Anzahl der in der RTD typisierbaren Stämme zu vergrößern. Die Höhe der Typisierungsrate eines Pyocinsatzes in der RTD dürfte dafür bestimmend sein, ob die verwendeten Pyocine für die Typisierung geeignet sind oder nicht.

Bei der Pyocin-Empfindlichkeit der Testkulturen ergab sich, daß in der RTD 54,9 % und in der 100 x RTD 83,5 % aller Kulturen sich als typisierbar erwiesen. Die Reaktionshäufigkeit der einzelnen Standard-Pyocine mit den 91 Testkulturen stand in direktem Zusammenhang mit der Breite ihrer Lysespektren auf den 27 Standard-Indikatorstämmen. Pyocine mit einem breiten Lysespektrum wiesen auch eine hohe Reaktionshäufigkeit mit den Testkulturen auf. Sowohl in der RTD als auch in der 100 x RTD waren bei einigen Testkulturen identische Lysebilder zu beobachten, wobei in zahlreichen Fällen festzustellen war, daß Pseudomonaden-Kulturen, deren Pyocin-Empfindlichkeitsmuster in der RTD übereinstimmte, in der 100 x RTD ein unterschiedliches Reaktionsbild aufwiesen. Es wurden neben den eindeutig positiven Pyocinreaktionen auch solche mit schwacher Wachstumshemmung berücksichtigt. Das war ein weiterer Beweis dafür, daß Lysebilder, die mit unverdünnten und damit unterschiedlichen Pyocinkonzentrationen erzielt wurden, nicht vergleichbar waren.

Einige Kulturen gehörten bei Anwendung ihrer Pyocine in unverdünnter Form dem gleichen Pyocin-Typ an. Wurden die gleichen Pyocine dagegen in verschiedenen Verdünnungsstufen geprüft, so ergaben sich zum Teil unterschiedliche Reaktionsbilder. Somit erwies sich unter Berücksichtigung der Typisierungsergebnisse in allen Verdünnungsstufen keine der untersuchten Testkulturen mit einer anderen identisch.

Allerdings stellte sich die Frage, ob für die Identität zweier Stämme ein solcher Maßstab zugrunde gelegt werden konnte, da den Reaktionen mit schwacher Wachstumshehmung ein gewisser Unsicherheitsfaktor anhaftete. Die Beurteilung dieser Reaktion wurde oftmals durch die unterschiedliche Dichte des jeweiligen Bakterienrasens erschwert. Dies dürfte besonders bei der Reproduzierbarkeit der Typisierungsergebnisse eine Rolle spielen. Allerdings wäre bei dem Vorhandensein von gleichen Reaktionsbildern in allen Verdünnungsstufen die Identität zweier Kulturen eindeutiger zu bestimmen. Für die Standardisierung erschien es wichtig, die Pyocine näher zu charakterisieren. Aus diesem Grund wurde versucht, neben der Beschreibung der Pyocine durch ihre Lysespektren auf den Standard-Indikatorstämmen, einige Pyocine durch ihre serologische Neutralisationskonstante und mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese zu charakterisieren. Bei der Ermittlung der Anti-Pyocin-Titer war festzustellen, daß alle untersuchten Pyocine sowohl durch ihre homologen als auch ihre heterologen Antiseren in ihrer Wirkung neutralisiert wurden. Somit waren die Pyocine in serologischer Hinsicht weitgehendst verwandt<sup>34,35,69</sup>. Die Neutralisationswerte der Pyocine durch ihre Antiseren waren, im Gegensatz zu der Bestimmung der Inaktivierungsrate von Testphagen<sup>2</sup>, nur auf indirektem Wege durch Anlegen von 2-fachen Verdünnungsreihen zu ermitteln. Neutralisationswerte, die zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen lagen, konnten somit nicht bestimmt werden. Dies spielte aber für die Beurteilung der serologischen Verwandtschaft keine Rolle, da es hierbei weniger auf den absoluten Wert der Neutralisationskonstanten als auf ihr Verhältnis zwischen den homologen und heterologen Pyocinen ankam. Eine eindeutige serologische Gruppenbildung war bei den untersuchten Pyocinen nicht festzustellen. Die Pyocinreaktionen auf den Testkulturen ließen keine Beziehung zu den serologischen Eigenschaften der Pyocine erkennen.

Eine diskelektrophoretische Charakterisierung der Pyocine gelang nicht, da die Pyocine wahrscheinlich wegen ihres Molekulargewichtes und wegen ihrer spezifischen Struktur nicht in das Trenngel einwandern konnten. Eine weitere Herabsetzung der Polyacrylamidgel-Konzentration war nicht zweckmäßig, da unterhalb einer Konzentration von 3,75 % eine vollständige Polymerisation des Trenngels nicht mehr eintrat.

Die Pyocine zeigten auf ihren homologen Indikatorstämmen in der RTD teilweise bis zu 65 Tagen eine unveränderte Aktivität, was auf eine größere Stabilität schließen ließ als sie bei anderen Untersuchungen<sup>47</sup> ermittelt worden war. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten darauf beruhen, daß verschiedene Indikatorstämme für die einzelnen Pyocine verwendet wurden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben, daß es für die Vergleichbarkeit von Typisierungsergebnissen wichtig ist, die Pyocine quantitativ zu bestimmen. Dies konnte auf der Basis einer Routine-Test-Dilution (RTD) erreicht werden.

## 7.0 Zusammenfassung

Zur Standardisierung der Pyocintypisierung von P. aeruginosa wurden 21 Standard-Pyocine auf 27 Standard-Indikatorstämmen quantitativ bestimmt. Dabei konnte für alle Pyocine die Mindestkonzentration (RTD) ermittelt werden, die auf den entsprechenden Standard-Indikatorstämmen gerade noch eine konfluierende Lyse hervorrief. In dieser Konzentration und in der 100 x RTD wurden die Standard-Pyocine durch ihre Lysepektren auf den Standard-Indikatorstämmen charakterisiert. Mit den so "standardisierten" Pyocinen waren von 91 P. aeruginosa-Kulturen in der RTD 54,9 % und in der 100 x RTD 83,5 % typisierbar. Alle untersuchten Kulturen produzierten selbst Pyocine, die wiederum auf den Standard-Indikatorstämmen nachgewiesen werden konnten. Die einzelnen Kulturen unterschieden sich voneinander durch ihr Pyocin-Empfindlichkeitsmuster in der RTD und in der 100 x RTD und durch das Lysepektrum ihrer Pyocine auf den 27 Standard-Indikatorstämmen. Die Pyocine wurden weiterhin durch ihre serologische Neutralisationskonstante charakterisiert. Zur Herstellung der Antisera wurden dabei 8 Pyocine durch fraktioniertes Ausfällen mit Ammoniumsulfat etwa 9-fach angereichert. Eine Charakterisierung dieser Pyocine durch die Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese war nicht möglich.

S.O Literaturverzeichnis

1. Abbott, J.D.      A method for typing Shigella sonnei  
Shannon, R.      using colicine production as a marker.  
J. clin. Path. 11, 71 (1958)
2. Adams, M.      -"Bacteriophages".  
Intersciens Publishers  
New York (1959)
3. Adler, J.L.      Susceptibility of recent isolates of  
Finland, M.      Pseudomonas aeruginosa to gentamicin,  
polymyxin and five penicillins with  
observations on the pyocin and immuno-  
types of the strains.  
Appl. Microbiol. 22, 870-875 (1971)
4. Ayliffe, G.A.J.      Hospital infection with Pseudomonas  
Lowbury, E.J.L.      aeruginosa in neurosurgery.  
Hamilton, J.G.      Lancet II, 365 (1965)  
Small, J.M.  
Asheshow, E.A.  
Parker, M.T.
5. Bonin, W.      Typisierung "boviner" Staphylokokken.  
Elobel, H.      Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.  
205, 309-318 (1967)
6. Bradley, D.E.      Ultrastructure of bacteriophages and  
bacteriocins.  
Bact. Reviews 31, 230-314 (1967)
7. Brandis, H.      Bacteriocine und bacteriocinähnliche  
Smarda, J.      Substanzen in "Infektionskrankheiten  
und ihre Erreger"  
Herausgeg. von R. Bieling, J. Kathe,  
W. Köhler, A. Mayr  
G. Fischer Verlag, Jena (1971)

8. Brückler, J.      Vertikale Polyacrylamidgel-Disk-  
Baxi, K.K.      Elektrophorese von Pasteurella  
Blobel, H.      multocida-Proteinen.  
Zbl. Vet. Med. B, 17, 564-568 (1970)
9. Caselitz, F.H.    Pseudomonas-Aeromonas und ihre human-  
medizinische Bedeutung.  
G. Fischer Verlag, Jena (1966)
10. Christie, R.      Observations on the biochemical and  
serological characteristics of  
Pseudomonas pyocyanea.  
Austr. J. exp. Biol. Med.  
Sci. 26, 425 (1948)
11. Csizsár, K.      Pyocine Typing of Pseudomonas aerugi-  
Lanyi, B.      nosa: Association between antigenic  
structure and pyocine type.  
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 17,  
361-370 (1970)
12. Darrell, J.H.    Pyocine-typing of hospital strains of  
Wahba, A.H.      Pseudomonas pyocyanea.  
J. clin. Path. 17, 236-242 (1964)
13. Davis, B.J.      Disc-Electrophoresis. II. Method and  
application in human serum proteins.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427 (1964)
14. Ende, M. Van den    Observations on the antigenic structure  
of Pseudomonas aeruginosa.  
J. Hyg. Camb. 50, 405-414 (1952)

15. Ende, M. Van den      The bacteriophages of Pseudomonas  
Phyllis, A.      aeruginosa filtration, measurements  
Dor, W.      and electron microscopy.  
Elford, J.      J. Hyg. (Camb.) 50, 12-20 (1952)  
Challice, C.E.  
Dawson, I.M.  
Hotchin, J.L.
16. Farmer, J.J.      Epidemiological fingerprinting of  
Herman, L.G.      Pseudomonas aeruginosa by the pro-  
duction of and sensitivity to pyocin  
and bacteriophage, Appl. Microbiol. 18,  
760-765 (1969)
17. Finland, M.      Occurrence of serious bacterial infec-  
Jones, W.F.      tions since introduction of anti-  
Barnes, M.W.      bacterial agents.  
J.A. M. A. 120, 2188-2197
18. Fisk, R.T.      Studies on staphylococci.  
I. Occurrence of bacteriophage carriers  
among strains of Staphylococcus aureus.  
J. infekt Dis. 71, 153 (1942)
19. Gillies, R.R.      Typing of Pseudomonas pyocyanea by  
Govan, J.R.W.      pyocine production.  
J. Path. Bact. 91, 339-345 (1966)
20. Götze, R.      Paarungs- und Besamungsinfektionen beim  
Rind.  
Dtsch. tierärztl. Wschr. 57, 377-382  
(1950)
21. Gould, J.C.      A study of the use of agglutinating sera  
McLeod, J.W.      and phage lysis in the classification of  
strains of Pseudomonas aeruginosa.  
J. Path. Bact. 79, 295-311 (1960)

22. Govan, J.R.W. Further studies in the pyocine typing  
Gillies, R.R. of Pseudomonas pyocyanea.  
J. Med. Microbiol. 2, 17-25 (1969)
23. Gratia, A. Diversité des souches antibiotiques de  
Fredericq, P. B. coli et étendue variable de leur  
champs d'action.  
C.r. Soc. biol. 140, 1032 (1946)
24. Grün, V.L. Differenzierung von Pseudomonas pyocyanea  
Pillich, J. mittels Bakteriophagen.  
Heyn, U. Arch. Hyg. Bakt. 151, 640-646 (1967)
25. Habs, I. Untersuchungen über die O-Antigene von  
Pseudomonas aeruginosa.  
Z. Hyg. 144, 218-228 (1957)
26. Higerd, T.B. In vitro and in vivo characterization of  
Baechler, Ch.A. pyocin.  
Berk, R.S. J. Bacteriol. 93, 1976-1986 (1967)
27. Higerd, T.B. Morphological studies on relaxed and  
Baechler, Ch.A. contracted forms of purified pyocin  
Berk, R.S. particles  
J. Bacteriol. 98, 1378-1389 (1969)
28. Holland, I.B. Bacteriocins, in "Antibiotics"  
Vol. I, ed. by D. Gottlieb and P.D. Shaw,  
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New  
York (1967)
29. Holloway, B.W. Grouping Pseudomonas aeruginosa by lyso-  
genicity and pyocinogenicity  
J. Path. Bact. 80, 448-450 (1960)

30. Homma, J.Y.     A simple protein with pyocine activity isolated  
Suzuki, N.         from the cell-wall of Pseudomonas aeruginosa  
                      and its close relation to endotoxin.  
Jap. J. exp. Med. 31, 209-213 (1961)
31. Homma, J.Y.     "Cell-wall protein A" of Pseudomonas aeruginosa  
Suzuki, N.         and its relationship to "original endotoxin  
                      protein".  
J. Bact. 87, 630-640 (1964)
32. Homma, J.Y.     Studies on the bacterial surface structure  
Suzuki, N.         of gram-negative bacteria and its biological  
Fukuyama, S.       active substances.  
                      IV. Pyocine activity of the endotoxin protein  
                      of Pseudomonas aeruginosa.  
Jap. J. Bacteriol. 17, 123-129 (1962)
33. Homma, J.Y.     The temperate phages having serological  
Watabe, H.         relationship with the "phage bound pyocine".  
Tanabe, Y.         Jap. J. exp. Med. 38, 213 (1968)
34. Homma, J.Y.     Relationship between pyocine and temperate  
Goto, S.            phage of Pseudomonas aeruginosa  
Shionoya, H.       II. Isolation of pyocines from strain  
                      P1-III and their characteristics.  
Jap. J. exp. Med. 37, 373-393 (1967)
35. Homma, J.Y.     Relationship between pyocine and temperate  
Shionoya, H.       phage of Pseudomonas aeruginosa.  
                      III. Serological relationship between  
                      pyocines and temperate phages.  
Jap. J. exp. Med. 37, 395-415 (1967)
36. Hugh, R.         The taxonomic significance of fermentative  
Leifson, E.         versus oxidative metabolism of carbohydrates  
                      by various gramnegative bacteria.  
J. Bact. 66, 24-26 (1953)

37. Ikeda, K.                   Studies of a pyocin. II. Mode of production  
Kageyama, M.               of the pyocin.  
Egami, F.                   J. Biochem. 55, 54 (1964)
38. Ishii, S.                  The fine structure of a pyocin.  
Nishi, Y.                   J. Mol. Biol. 13, 428-431 (1965)  
Egami, F.
39. Jacob, F.                  Biosynthèse induite et mode d'action d'une  
pyocine, antibiotique de Pseudomonas  
pyocyanea.  
Ann. Inst. Pasteur 86, 149-160 (1953)
40. Jacob, F.                  Comparaison entre la biosynthèse induite de  
Siminovitch, L.           la colicine et des bactériophages et entre  
Wollman, E.L.           leur mode d'action.  
Ann. Inst. Pasteur 84, 313 (1953)
41. Kageyama, M.              Studies of a pyocin.  
I. Physical and chemical properties.  
J. Biochem. 55, 49-53 (1964)
42. Kageyama, M.              Studies of a pyocin.  
Ikeda, K.                   III. Biological properties of the pyocin.  
Egami, F.                   J. Biochem. 55, 59 (1964)
43. Kaziro, F.                Studies on the mode of action of pyocin.  
Tanaka, M.                  I. Inhibition of macromolecular synthesis  
in sensitive cells.  
J. Biochem. 57, 689 (1965)
44. Kaziro, Y.                II. Inactivation of ribosomes.  
Tanaka, M.                  J. Biochem. 58, 357 (1965)
45. Kielwein, G.              Untersuchungen über die milchhygienische  
Bedeutung von Pseudomonaden und Aero-  
monaden.  
Habilitationsschrift Gießen (1970)

46. Kielwein, G. Die Isolierung und Differenzierung von Pseudomonaden aus Lebensmitteln. Arch. Lebensmittelhyg. 2, 29-37 (1971)
47. Kirchner, P. Die Typisierung von Pseudomonas aeruginosa mit Pyocinen. Vet.med. Dissertation Gießen 1971
48. Kleinmeier, H. Müller, H. Vergleichende Prüfung der Präzipitation und Agglutination zur Bestimmung der O-Antigene von Pseudomonas aeruginosa. Zbl. Bakt. (Alt. I. Orig.) 172, 54-65 (1958)
49. Kleinmeier, H. Schreiner, E. Graeff, H. Untersuchungen über die serodiagnostischen Differenzierungsmöglichkeiten und thermolabilen Antigene von Pseudomonas aeruginosa. Zschr. Immun-Forsch. 115, 282-302 (1958)
50. Kleinmeier, H. Die O-Gruppenbestimmung von Pseudomonas-Stämmen mittels Objektträger-Agglutination. Zbl. Bakt. (Abt. I. Orig.) 170, 570-583 (1957)
51. Knights, H.T. France, D.R. Harding, S. Pseudomonas aeruginosa cross infection in a neonatal unit. N.Z. Med. J. 67, 617 (1968)
52. Köhler, W. Zur Serologie der Pseudomonas aeruginosa. Zschr. Immun. Forsch. 114, 282-302 (1957)
53. Kovacs, N. Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxydase reaction. Nature 178, 703 (1956)
54. Lewis, M.S. A new method of pyocine typing. J. clin. Path. 20, 103 (1967)

55. Lowry, O.H. Protein measurement with the folin  
Rosenbrough, N.T. phenol reagent.  
Farr, A.L. J. biol. chem. 123, 265-275 (1951)  
Randall, R.J.
56. Maurer, H.R. Theorie und Praxis der diskontinuier-  
lichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.  
Walter de Gruyter et Co., Berlin (1968)
57. Lücke, A. Die sog. blaue Eiterung und ihre Ursachen.  
Arch. klin. Chir. 3, 135-157 (1862)
58. Mikkelsen, O.S. Serotyping of Pseudomonas aeruginosa.  
1. Studies on the production of anti-O-  
sera.  
Acta path. microbiol. scand. 73, 373-390  
(1968)
59. Mikkelsen, O.S. Serotyping of Pseudomonas aeruginosa.  
2. Results of an O-group classification.  
Acta path. microbiol. 163-175 (1970)
60. Mushin, R. Persönliche Mitteilungen.  
Ziv, G.
61. Mushin, R. Persönliche Mitteilungen.  
Ziv, G.
62. Neuman, H.J. Bacterium pyocyaneum (Pseudomonas  
Seeling, G. aeruginosa) als Mastitiserreger.  
Prakt. Tierarzt 2, 245-254 (1956)
63. Osman, M.A.M. Pyocine typing of Pseudomonas aeruginosa.  
J. clin. Path. 18, 200-202 (1965)

64. Papavassiliou, J. Actions antibiotiques réciproques  
chez Pseudomonas aeruginosa.  
Arch. Inst. Pasteur, Tunis 38, 57 (1961)
65. Phillips, I. Acetic acid in the treatment of  
Lobo, A.Z. superficial wounds infected by  
Fernandes, R. Pseudomonas aeruginosa.  
Gundara, N.S. Lancet I, 11 (1968)
66. Pulverer, G. Zur Biochemie und Fermentstruktur von  
Korth, H. Pseudomonas aeruginosa.  
Zbl. Bakt. I. Abt. 186, 36-54 (1961)
67. Rabin, E.R. Fatal Pseudomonas infection in burned  
Graber, C.D. patients.  
Vogel, E.H. New Engl. J. Med. 265, 1125-1231 (1961)  
Finkelstein, R.A.  
Tumbusch, W.A.
68. Shannon, R. Colicine production as a method for  
typing.  
Bact. coli 055 : B5.  
J. med. Lab. Technol. 14, 199 (1957)
69. Shionoya, H. Relationship between pyocine and temperate  
Goto, S. phage of Pseudomonas aeruginosa.  
Tsukamoto, M. I. Isolation of temperate phages from  
Homma, J.Y. strain. P1-III and their characteristics.  
Jap. J. exp. Med. 37, 359-372 (1967)
70. Sjöberg, L. Phage and pyocine typing of Pseudomonas  
Lindberg, A.A. aeruginosa.  
Acta path. microbiol. scand. 70, 639-640

71. Schmitt, J. Das Differenzieren tierischer Proteine mit der vertikalen Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese.  
Deut. Tierärztl. Wochenschrift Nr. 4,  
75. Jahrgang 87-91 (1968)
72. Trommsdorf, R. Zur Kenntnis des Bakterium pyocyaneum und seiner Beziehungen zu den fluoreszierenden Bakterien.  
Zbl. Bakt. (I. Abt. Orig.) 78, 405-414 (1916)
73. Wahba, A.H. Hospital infection with Pseudomonas pyocyanea: an investigation by a combined pyocine and serological typing method.  
Brit. Med. J. 1, 86-89 (1965)
74. Wahba, A.H. Pyocine typing of Pseudomonas pyocyanea and its relation to serological typing.  
Zbl. Bakt. I. Orig. 196, 389 (1965)
75. Weber, G. Pseudomonas aeruginosa im Trinkwasser als Todesursache bei Neugeborenen.  
Werner, H.-P. Matschnigg, H. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 216, 210-214 (1971)
76. Zabransky, R.J. Pyocine typing of clinical strains of Day, F.E. Pseudomonas aeruginosa.  
Bact. Proc. 97 (1967)
77. Zabransky, R.J. Pyocine typing of clinical strains of Day, F.E. Pseudomonas aeruginosa.  
Appl. Microbiol. 17, 293-296 (1969)
78. Ziv, G. Pyocine typing as an epidemiological marker in Pseudomonas aeruginosa Mushin, R. mastitis cattle.  
Tagg, J.R. J. Hyg. 69, 171-177 (1971)

Herrn Professor Dr. H. Blotel danke ich  
für die Themastellung und die jederzeit  
gewährte fachliche Unterstützung.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. W. Scharmann  
für seine stets hilfreiche Beratung bei der  
Durchführung der Arbeit.

## Lebenslauf

- 1945            3. August geboren in Unterhaun  
                 Krs. Hersfeld
- 1952 - 1956    Volksschule in Unterhaun
- 1956 - 1965    Alte Klosterschule, Gymnasium für Jungen  
                 und Altsprachliches Gymnasium, in Bad Hersfeld
- 1965            15. Februar Reifeprüfung
- 1965 - 1966    Studium der Volkswirtschaftslehre an der  
                 Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M.
- 1966 - 1971    Studium der Veterinärmedizin an der  
                 Justus Liebig-Universität Gießen
- 1970            August - Oktober Veterinärpraktikantenzeit bei  
                 Herrn Dr.R. Brandenburg in Alsfeld
- 1971            Februar - Juni Tierärztliche Prüfung  
                 12. Juli Approbation
- 1971 - 1972    Anfertigung dieser Dissertation am Institut für  
                 Bakteriologie und Immunologie der Justus Liebig-  
                 Universität Gießen unter Anleitung von  
                 Professor Dr.H. Blobel
- seit 1971      Als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für  
                 Bakteriologie und Immunologie der Justus Liebig-  
                 Universität angestellt.

|      |      |
|------|------|
| 1970 | 1970 |
| 1971 | 1971 |
| 1972 | 1972 |
| 1973 | 1973 |
| 1974 | 1974 |
| 1975 | 1975 |
| 1976 | 1976 |
| 1977 | 1977 |
| 1978 | 1978 |
| 1979 | 1979 |
| 1980 | 1980 |
| 1981 | 1981 |
| 1982 | 1982 |
| 1983 | 1983 |
| 1984 | 1984 |
| 1985 | 1985 |
| 1986 | 1986 |
| 1987 | 1987 |
| 1988 | 1988 |
| 1989 | 1989 |
| 1990 | 1990 |
| 1991 | 1991 |
| 1992 | 1992 |
| 1993 | 1993 |
| 1994 | 1994 |
| 1995 | 1995 |
| 1996 | 1996 |
| 1997 | 1997 |
| 1998 | 1998 |
| 1999 | 1999 |
| 2000 | 2000 |
| 2001 | 2001 |
| 2002 | 2002 |
| 2003 | 2003 |
| 2004 | 2004 |
| 2005 | 2005 |
| 2006 | 2006 |
| 2007 | 2007 |
| 2008 | 2008 |
| 2009 | 2009 |
| 2010 | 2010 |
| 2011 | 2011 |
| 2012 | 2012 |
| 2013 | 2013 |
| 2014 | 2014 |
| 2015 | 2015 |
| 2016 | 2016 |
| 2017 | 2017 |
| 2018 | 2018 |
| 2019 | 2019 |
| 2020 | 2020 |
| 2021 | 2021 |
| 2022 | 2022 |
| 2023 | 2023 |
| 2024 | 2024 |
| 2025 | 2025 |
| 2026 | 2026 |
| 2027 | 2027 |
| 2028 | 2028 |
| 2029 | 2029 |
| 2030 | 2030 |
| 2031 | 2031 |
| 2032 | 2032 |
| 2033 | 2033 |
| 2034 | 2034 |
| 2035 | 2035 |
| 2036 | 2036 |
| 2037 | 2037 |
| 2038 | 2038 |
| 2039 | 2039 |
| 2040 | 2040 |
| 2041 | 2041 |
| 2042 | 2042 |
| 2043 | 2043 |
| 2044 | 2044 |
| 2045 | 2045 |
| 2046 | 2046 |
| 2047 | 2047 |
| 2048 | 2048 |
| 2049 | 2049 |
| 2050 | 2050 |
| 2051 | 2051 |
| 2052 | 2052 |
| 2053 | 2053 |
| 2054 | 2054 |
| 2055 | 2055 |
| 2056 | 2056 |
| 2057 | 2057 |
| 2058 | 2058 |
| 2059 | 2059 |
| 2060 | 2060 |
| 2061 | 2061 |
| 2062 | 2062 |
| 2063 | 2063 |
| 2064 | 2064 |
| 2065 | 2065 |
| 2066 | 2066 |
| 2067 | 2067 |
| 2068 | 2068 |
| 2069 | 2069 |
| 2070 | 2070 |
| 2071 | 2071 |
| 2072 | 2072 |
| 2073 | 2073 |
| 2074 | 2074 |
| 2075 | 2075 |
| 2076 | 2076 |
| 2077 | 2077 |
| 2078 | 2078 |
| 2079 | 2079 |
| 2080 | 2080 |
| 2081 | 2081 |
| 2082 | 2082 |
| 2083 | 2083 |
| 2084 | 2084 |
| 2085 | 2085 |
| 2086 | 2086 |
| 2087 | 2087 |
| 2088 | 2088 |
| 2089 | 2089 |
| 2090 | 2090 |
| 2091 | 2091 |
| 2092 | 2092 |
| 2093 | 2093 |
| 2094 | 2094 |
| 2095 | 2095 |
| 2096 | 2096 |
| 2097 | 2097 |
| 2098 | 2098 |
| 2099 | 2099 |
| 2100 | 2100 |



